

**Université de Sherbrooke**

**INFLUENCE DE CA125 SUR LE PROCESSUS DE TRANSITION**

**ÉPITHÉLIUM-MÉSENCHYMATEUSE DES CELLULES**

**DE CANCER DE L'OVAIRE**

**par**

**Marina Comamala Torres**

**Département de Microbiologie et Infectiologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé**

**en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie**

Évaluateurs : Du Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Dre. Claudine Rancourt  
(Directrice des travaux) et Dr. Antonio Conconi et du Département de Biologie Cellulaire,

Dr. Jean François Beaulieu

**Janvier 2009**



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-70795-1  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-70795-1

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■ ■ ■  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières-----	I
Liste des figures-----	VI
Liste des tableaux-----	X
Liste des sigles et abréviations-----	XI
Résumé	

### INTRODUCTION

1. Le cancer-----	1
1.1 Généralités-----	1
1.2 Carcinogénèse-----	2
1.2.1 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs-----	2
1.2.2 Mutagènes et carcinogènes-----	4
1.2.3 Avantages acquis par une cellule cancéreuse-----	5
1.2.3.1 L'autosuffisance aux signaux de croissance-----	6
1.2.3.2 L'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance-----	8
1.2.3.3 La résistance à l'apoptose-----	8
1.2.3.4 L'immortalisation des cellules-----	9
1.2.3.5 L'angiogénèse-----	10
1.2.3.6 L'invasion et la formation de métastase-----	10
1.3 Progression tumorale des carcinomes-----	11
2. Interactions cellule-cellule-----	12
2.1 Les complexes de jonction : les jonctions adhérentes et les cadhérines-----	16
2.2 Certains rôles des cadhérines classiques dans les cellules et les tissus-----	18
2.3 E-cadhérine : suppresseur de l'invasion des tumeurs épithéliales-----	19
3. Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)-----	21

3.1	Caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymateuses-----	23
3.2	L'importance du processus d'EMT-----	26
3.3	Événements moléculaires qui régulent l'EMT-----	27
4.	Le cancer de l'ovaire-----	32
4.1	Facteurs de risques associés au cancer de l'ovaire-----	33
4.2	Classification du cancer de l'ovaire-----	35
4.3	Présentation clinique, diagnostic et traitement du cancer ovarien-----	36
4.4	Processus d'EMT dans la physiologie des ovaires, développement et progression tumorale-----	37
5.	Glycoprotéines multifonctionnelles: les mucines-----	39
5.1	Les mucines dans le développement du cancer de l'ovaire et autres cancers-----	43
5.2	MUC16 (CA125)-----	46
5.2.1	Découverte de MUC16-----	47
5.2.2	La structure et les domaines de CA125-----	43
5.2.3	CA125: marqueur antigénique du cancer de l'ovaire-----	53
5.2.4	Les fonctions proposées de CA125-----	55
6.	Modèles cellulaires établis au laboratoire permettant l'étude fonctionnelle de CA125-----	56
6.1	Modèle de perte de fonction (knockdown)-----	57
6.2	Modèle gain de fonction : expression des domaines cytoplasmiques de CA125-----	59
6.3	Modèle gain de fonction : expression des domaines extracellulaires de CA125--	61
6.4	Résultats obtenus dans le laboratoire permettant d'établir une relation entre CA125 et le potentiel métastatique des cellules de cancer de l'ovaire-----	64
7.	Hypothèse et objectifs du projet-----	65
MATÉRIEL ET MÉTHODES-----		67
8.	Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire-----	67
9.	Essai de migration par blessure de la monocouche de cellules-----	68



10.	Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden-----	69
11.	Immunofluorescence indirecte sur lame-----	70
12.	Microscopie électronique-----	72
13.	Lyse cellulaire-----	72
14.	Dosage de protéines-----	73
15.	Gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type western-----	74
16.	Exposition des cellules aux différents facteurs de croissance-----	76
17.	Exposition des cellules aux divers inhibiteurs des molécules de signalisation----	77
RÉSULTATS-----		78
18.	Évaluation des capacités migratoires du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)-----	78
19.	Analyse des protéines des jonctions cellulaires et du cytosquelette du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)-----	82
19.1	Changement de la localisation et de l'expression d'E-cadhérine dans les cellules CA125 knockdown-----	82
19.2	Modification de la localisation et de l'expression de claudine-7 dans les clones CA125 knockdown-----	85
19.3	Modifications observées de certaines protéines du cytosquelette dues à la perte de CA125 de la membrane cellulaire-----	88
19.3.1	Cytokératine 8-18-----	88
19.3.2	F-actine-----	90
19.4	Expression des marqueurs mésenchymateux chez les cellules du cancer de l'ovaire CA125 knockdown-----	92
19.4.1	Vimentine-----	92
19.4.2	N-cadhérine-----	94
20.	Caractérisation des jonctions cellulaires par microscopie électronique chez le modèle perte de fonction de CA125-----	96

21.	Évaluation des capacités migratoires du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125: SKOV-3 CTD)-----	98
22.	Analyse des modifications des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux chez les cellules du modèle gain de fonction (expression des domaines cytoplasmiques de CA125)-----	102
22.1	Changement de l'expression d'E-cadhérine et claudine-7 chez la population SKOV-3 CTD-----	103
22.2	Changement de l'expression de vimentine et N-cadhérine chez la population SKOV-3 CTD-----	105
23.	Évaluation des capacités migratoires du modèle gain de fonction (expression des domaines unique et unique + 1 répétition de CA125 : SKOV-3 TMU et TMU+1R)-----	107
24.	Analyse des protéines des jonctions cellulaires et du cytosquelette du modèle gain de fonction (expression des domaines extracellulaires de CA125)-----	113
24.1	Détermination des modifications des marqueurs épithéliaux chez les cellules du modèle gain de fonction-----	113
24.2	Statut de la F-actine du cytosquelette chez le modèle gain de fonction-----	115
25.	Analyse de la vimentine et la N-cadhérine chez les populations du modèle gain de fonction-----	117
26.	Évaluation des capacités migratoires du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)-----	119
27.	Effets des facteurs de croissance sur la migration des cellules de cancer de l'ovaire CA125 knockdown-----	122
28.	EGF provoque la migration des cellules CA125 knockdown d'une manière indépendante de la dose-----	125
29.	Des inhibiteurs d'EGFR bloquent la migration cellulaire induite par EGF chez les clones CA125 knockdown-----	127
	DISCUSSION ET CONCLUSIONS-----	131

30.	L'antigène tumoral CA125 influence avec le processus d'EMT des cellules de cancer de l'ovaire-----	135
31.	EGF stimule la migration des clones CA125 knockdown-----	137
32.	Le domaine CTD de CA125 favorise l'EMT des cellules de cancer de l'ovaire-----	139
33.	Les domaines TMU et TMU+1R de CA125 ne modifient pas le comportement des cellules SKOV-3-----	142
34.	Conclusions et modèle proposé-----	143
35.	Perspectives-----	147
REMERCIEMENTS-----		148
RÉFÉRENCES-----		150

## LISTE DES FIGURES

1.	Hypothèses du "double coup" de Knudson dans la tumorigenesis impliquant un gène suppresseur de tumeurs (TSG) -----	4
2.	Les six caractéristiques nécessaires au développement du cancer-----	6
3.	Différents types des cellules retrouvés chez les tumeurs -----	7
4.	Molécules d'adhésion cellulaire-----	13
5.	Adhésion cellule-matrice extracellulaire-----	14
6.	Différents mécanismes d'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire-----	15
7.	Représentation schématique du complexe cadhérines classiques-caténines-----	18
8.	Le cycle de plasticité des cellules épithéliales-----	23
9.	Images de la Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) -----	25
10.	EMT dans le développement, l'invasion et la métastase-----	27
11.	Schématisation des voies de signalisation associées avec l'EMT-----	31
12.	Types histologiques du carcinome épithélial de l'ovaire-----	36
13.	Progression néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire-----	39
14.	Structure des principales mucines transmembranaires-----	42
15.	Structure de CA125 proposée par le groupe O'Brien en 2001-----	49
16.	Représentation schématique d'une unité répétitive de CA125-----	51
17.	Courbes de survie de Kaplan-Meier spécifiques du cancer ovarien -----	55
18.	Validation des clones knockdown pour CA125-----	58
19.	Validation de la population SKOV3-MUC16-CTD-----	60

20.	Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires (domaines extracellulaires de CA125) -----	62
21.	Localisation cellulaire des protéines de fusion MUC16-UTM et -1RUTM-----	63
22.	Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle perte de fonction -----	79
23.	Dénombrement des cellules du modèle perte fonction ayant traversées les membranes poreuses des chambres de Boyden -----	80
24.	Essai de migration par l'utilisation des chambres de Boyden chez les cellules CA125 knockdown -----	81
25.	Immunofluorescence pour l'E-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	83
26.	Co-marquage de l'E-cadhérine et du réticulum endoplasmique -----	84
27.	Immunobuvardage de type Western pour l'E-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	85
28.	Immunofluorescence pour claudine-7 chez les cellules du modèle perte de fonction-----	87
29.	Immunobuvardage de type Western pour la claudine-7 chez les cellules du modèle perte de fonction -----	88
30.	Immunofluorescence pour la cytokératine 8-18 chez les cellules du modèle perte de fonction -----	89
31.	Immunofluorescence pour la F-actine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	91
32.	Immunobuvardage de type Western pour la vimentine chez les cellules du	

	modèle perte de fonction -----	93
33.	Immunofluorescence pour la vimentine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	94
34.	Immunofluorescence pour la N-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	95
35.	Immunobuvardage de type Western pour la N-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction -----	96
36.	Microscopie électronique des cellules du modèle perte de fonction -----	97
37.	Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125-----	99
38.	Essai de migration par l'utilisation des chambres de Boyden chez les cellules exprimant le domaine CTD de CA125 -----	101
39.	Dénombrement des cellules du modèle gain fonction exprimant le domaine CTD de CA125 ayant traversées la membrane poreuse des chambres de Boyden-----	102
40.	Immunofluorescence de l'E-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125-----	104
41.	Immunobuvardage de type Western pour E cadhérine et claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125 -----	104
42.	Immunofluorescence de la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125 -----	106
43.	Immunobuvardage de type Western pour la vimentine et la N cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125-----	107

44.	Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 -----	109
45.	Dénombrement des cellules du modèle gain fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 ayant traversées les membranes poreuses des chambres de Boyden -----	111
46.	Essai de migration par l'utilisation des chambres de Boyden chez les cellules exprimant domaines TMU et TMU+1R de CA125 -----	112
47.	Immunofluorescence de l'E-cadhérine et la claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 -	114
48.	Immunobuvardage de type Western de l'E cadhérine et la claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125-----	115
49.	Immunofluorescence de la F-actine chez les populations du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 -----	116
50.	Immunobuvardage de type Western pour la vimentine et la N cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 -----	118
51.	Immunofluorescence de la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125	119
52.	Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle perte de fonction (CA125 knockdown)-----	121
53.	Essai de blessure de la monocouche pour évaluer les effets des facteurs de croissance sur la migration cellulaire chez le modèle gain de fonction-----	123

54.	Essai de blessure de la monocouche pour évaluer les effets d'EGF sur la migration cellulaire chez le modèle gain de fonction-----	124
55.	Essai de blessure de la monocouche cellulaire pour évaluer la migration des clones CA125 knockdown selon la concentration d'EGF-----	126
56.	Des inhibiteurs d'EGFR bloquent la migration cellulaire induite par EGF chez les clones CA125 knockdown-----	129
57.	Modèle proposé-----	146

## LISTE DES TABLEAUX

1.	Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse-----	22
2.	Profil d'expression des mucines dans l'ovaire normal et les sous-types du carcinome ovarien-----	43
3.	Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés et conditions d'utilisation---	75



## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALT	Alternative lengthening of telomeres
ATCC	American Type Culture Collection
CAMs	Cell adhesion molecules
CA125	Carbohydrate antigen 125
CEO	Cancer épithélial de l'ovaire
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CTD	C-Terminal Domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
E-cadhérine	Cadhérine épithéliale
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EV	Empty Vector
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	crystalizable fragment (partie d'un anticorps)
FGFR2	Fibroblast-growth-factor receptor-2

FGFs	Fibroblast Growth Factors
FSP1	Fibroblast-specific protein-1
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3 $\beta$	Glycogen-synthase kinase-3 $\beta$
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor
IF	Immunoflouescence
Ig	Immunoglobuline
ILK	Integrin-linked kinase
KDEL	Lysine-Aspartate-Glutamine-Leucine
L	Litre
mA	Milliampère
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MET	Mesenchymal-epithelial transition
MFs	Microfilaments
mM	Millimolaire
MMPs	Matrix Metaloproteinases
MUC	Mucine
N-cadhérine	Cadhérine neural
NFAT	Nuclear factor of activated T cell
NK	Natural Killer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

OSE	Ovarian surface epithelium
PBS	Phosphate Buffered Saline
P-cadhérine	Cadhérine placentaire
PKB	Protein kinase B
PLC $\gamma$	phospholipase C
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
R-cadhérine	Cadhérine rétinale
RE	Réticulum endoplasmique
RTK	Receptor tyrosine kinase
scFv	Single-chain Fragment variable
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate Poly-acrylamide gel electrophoresis
SEA	Sea urchin, Enterokinase, Agrin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TM	Transmembranaire
TMU	Transmembranaire Unique
TMU+1R	Transmembranaire Unique +1 répétition
TSG	Tumor suppressor gene
uPA	Urokinase plasminogen activator
VE-cadhérine	Cadhérine de l'endothélium vasculaire
VEGF	Vascular endothelial growth factor

**Université de Sherbrooke**

**INFLUENCE DE CA125 SUR LE PROCESSUS DE TRANSITION ÉPITHÉLIUM-  
MÉSENCHYMATEUSE DES CELLULES DE CANCER DE L'OVAIRE**

par

Marina Comamala Torres

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

en vue de l'obtention du grade de maître en sciences (M.Sc.) en Microbiologie

Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est létal à cause de son potentiel d'invasion, sa progression insidieuse et sa capacité de métastase à travers la cavité péritonéal. L'antigène tumoral CA125 (MUC16) est le marqueur clinique du cancer de l'ovaire le plus important. Il est utilisé pour surveiller la progression de la maladie. L'antigène tumoral CA125 (MUC16) est une glycoprotéine de grand poids moléculaire (200-2000 kDa) de la famille des mucines transmembranaires. Il est encodé par le gène *MUC16* à partir d'un long ARNm de 66kb. L'expression de CA125 (MUC16) est retrouvée dans la majorité des cancers épithéliaux de l'ovaire (CEO) mais il n'est pas détecté dans l'épithélium normal des ovaires. Cependant, sa contribution au développement du CEO reste pratiquement inconnue. Il y a des évidences croissantes que les mucines transmembranaires sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire en régulant l'expansion cellulaire, l'adhésion cellulaire, la

migration et la mort cellulaire. Il est envisageable que CA125 (MUC16) pourrait exercer certaines de ces fonctions. Nos données supportent ce concept.

Pour étudier les fonctions de CA125, nous avons initialement développé un inhibiteur spécifique de CA125 qui consiste en un minianticorps de chaîne simple anti-CA125 (scFv) qui est retenu dans le réticulum endoplasmique et qui prévient la localisation de CA125 à la surface cellulaire, en imitant, par conséquence un knockdown de son expression. Des transfectants stables exprimant ce scFv ont été dérivés à partir de la lignée parentale NIH: OVCAR-3. Nous avons démontré que le knockdown de CA125 altère la morphologie cellulaire, inhibe l'agrégation cellulaire homotypique et de façon dramatique, il diminue la croissance cellulaire indépendante d'ancrage et la tumorigénicité chez les souris nues. Nous avons déterminé que CA125 interagit avec E-cadhérine,  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -actinine,  $\beta$ -actine. Plus tard, nous avons observé par immunofluorescence et par microscopie électronique que les cellules CA125 knockdown présentent des jonctions intercellulaires détériorées et un réarrangement des filaments d'actine, ce qui nous suggère que CA125 pourrait être associé aux jonctions intercellulaires et impliqué dans l'organisation du cytosquelette. La formation et la dissolution dynamique des complexes de jonction sont des processus centraux pendant la transition épithélio-mésenchymateuse. Le knockdown de CA125 augmente aussi la migration des cellules OVCAR-3. Nous avons constaté que le maintien de cette migration est dépendant de la présence du EGF dans le milieu de culture et qu'elle est presque exclusivement due à l'effet de ce facteur de croissance. L'ajout de différents inhibiteurs du récepteur d'EGF (EGFR) démontre une abolition presque complète de la migration cellulaire de clones CA125 knockdown. En plus, l'expression d'E-cadhérine et de claudine-7 est

significativement diminuée chez les cellules CA125 knockdown, tandis que l'expression de la vimentine et de N-cadhérine est augmentée, nous suggérant que la perte de CA125 cause une EMT chez ces cellules. De façon intéressante, l'expression ectopique du domaine C-terminal (CTD) de CA125 chez les cellules de cancer de l'ovaire SKOV-3 confère aux cellules les mêmes phénotypes indiquant que ce domaine peut être suffisant pour moduler ces comportements cellulaires. Le domaine C-terminal pourrait représenter ce qui reste de CA125 à la surface cellulaire après le clivage protéolytique causant le relâchement de la majorité de son domaine extracellulaire. Cependant, l'expression ectopique des domaines extracellulaires de CA125 (domaines transmembranaire et unique (TMU) ou transmembranaire-unique plus une des répétitions (TMU+1R)) ne confère pas d'effet sur les jonctions intercellulaires ni sur la migration évoquant que l'expression isolée de ces domaines ne donne pas un avantage et que d'autres portions et/ou répétitions de la molécule sont requises. Si nous prenons l'ensemble de nos données, ces résultats nous permettent de proposer que CA125 régule la tumorigénicité et le potentiel EMT/métastatique en modulant les complexes de jonction et l'organisation du cytosquelette. Ce projet a permis déterminer comment CA125 module ces comportements. Les effets du knockdown de CA125 sur les jonctions intercellulaires, l'adhésion cellulaire et la migration ont été comparés aux effets produits par l'expression forcée des différents domaines de CA125 (C-terminal, transmembranaire et une des répétitions). Une fois que les domaines ont été identifiés et liés à des phénotypes nous avons considéré qu'il était important de commencer à déterminer les voies de signalisation impliquées et modulées entre nos systèmes cellulaires. La présence du EGF dans le milieu de culture a donc été identifié comme un facteur essentiel permettant la migration de cellules CA125 knockdown.

Ces études contribuent de façon significative à notre compréhension des fonctions biologiques de CA125, son rôle dans le développement et progression du carcinome épithéliale de l'ovaire et suggèrent que CA125 pourrait éventuellement être une nouvelle cible moléculaire pour le traitement de cette maladie.

**Mots clés :** cancer épithélial de l'ovaire, CA125, transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), migration cellulaire.

# INTRODUCTION

## 1. Le cancer

### 1.1 Généralités

Le cancer est un terme général désignant toute maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain prolifèrent d'une manière anormale et incontrôlée au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice du cancer, qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Les possibilités de guérir d'un cancer atteignent aujourd'hui plus de 50%. Certains cancers ont même une guérison presque totale, et les progrès faits tant en matière de traitement, de détection et de prévention sont incessants. La fréquence de plusieurs types de cancers semble en augmentation de nos jours, pour des raisons environnementales, de modes de vie, ainsi que pour le vieillissement de la population.

Un homme sur deux et une femme sur trois seront atteints du cancer au cours de leur vie. La fréquence du cancer a été multipliée par 4 en 10 ans chez les femmes de 35 à 45 ans. L'incidence du cancer a doublé entre 1980 et 2005, mais le risque de mortalité dû à cette maladie a diminué de 25%. Près de 8 millions de personnes meurent chaque année du cancer dans le monde, soit 13% de la mortalité mondiale. D'après les projections, leur nombre devrait augmenter pour atteindre, selon les estimations, 12 millions en 2030 à l'échelle mondiale. (<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html>; OMS, 2007)



## **1.2 Carcinogenèse**

La transformation d'une cellule normale à une cellule cancéreuse est un processus qui implique trois aspects importants. Premièrement, des altérations génétiques particulières se produisent, c'est-à-dire des mutations des gènes (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) impliqués dans la régulation de la croissance et différenciation cellulaire (CROCE, 2008). Deuxièmement, des agents et événements (carcinogènes chimiques, radiations ionisantes, infections virales et bactériennes) causent ou facilitent les changements génétiques dans des cellules destinées à devenir cancéreuses (ZARIDZE, 2008). Finalement, les conséquences de ces changements génétiques dans la biologie de la cellule conféreront aux cellules les propriétés d'une cellule cancéreuse (HANAHAN, D; WEINBERG, R., 2000) et faciliteront des événements génétiques additionnels, amenant à la progression du cancer.

### **1.2.1 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs**

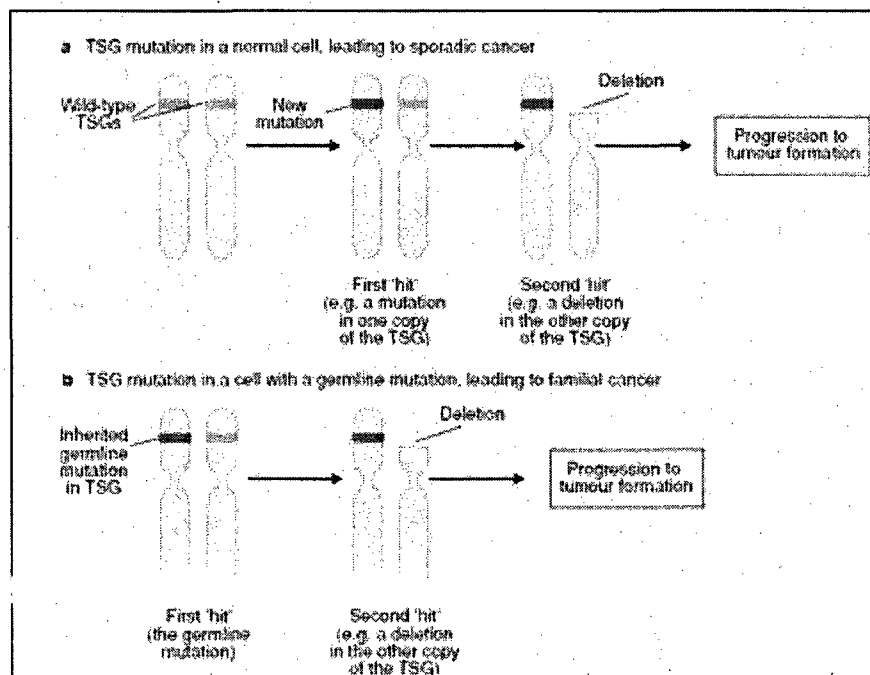
Les *oncogènes* encodent des protéines qui contrôlent la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ils peuvent être activés par des altérations structurales (mutations ou de fusion des gènes) (KONOPKA et al, 1985), par juxtaposition d'éléments amplificateurs (TSUJIMOTO et al, 1985) ou par amplification. Ces arrangements chromosomiques, mutations et amplifications peuvent se produire comme événements initiateurs (FINGER et al, 1986) ou pendant la progression tumorale. Ils confèrent un avantage de croissance et favorisent la survie des cellules qui portent ces altérations. Les produits des oncogènes peuvent être classifiés en six groupes : facteurs de transcription, modificateurs de la chromatine, facteurs de croissance,

récepteurs de facteurs de croissance, molécules de signalisation et régulateurs de l'apoptose. (CROCE, 2008)

La découverte des oncogènes a alimenté l'idée qu'une classe différente de gènes, les "anti-oncogènes", pourraient opposer leur effet et bloquer le développement tumoral. Des expériences de fusion de cellules somatiques ont signalé l'existence des gènes qui pouvaient supprimer la tumorigénicité. (HARRIS et al, 1969; STANBRIDGE, 1976). Les gènes suppresseurs de tumeurs prototypes sont récessifs, c'est à dire qu'ils exigent une inactivation de "double coup" des deux allèles. (KNUDSON, 1971 ; KNUDSON, 1973 ; COMMINGS, 1973). Typiquement, un allèle muté est hérité par la lignée germinale et l'autre allèle est perdu de façon somatique. Leur participation dans des syndromes de cancer familiaux indique qu'ils sont hautement pénétrants (Figure 1). Les *gènes suppresseurs de tumeurs* contrôlent un large éventail d'activités normales de la cellule : points de contrôle du cycle cellulaire, voies de signalisation mitogéniques, recyclage protéique, réparation à l'ADN, hypoxie et autres réponses au stress. (SHER, 2004)

**Figure 1: Hypothèse du "double coup" de Knudson dans la tumorigénèse impliquant un gène suppresseur de tumeurs (TSG)**

Une paire de chromosomes est représentée, avec un TSG [le gène normal (gris), le gène muté (rouge), et une délétion du gène (absence) sont montrés]. (a) Les individus normaux ont deux copies normales du TSG, donc, deux "coups" indépendants (mutations) sont requis dans la même cellule pour initialiser un cancer. (b) Les individus avec une mutation germinale du TSG ont déjà un premier "coup" dans chaque cellule et elles requièrent seulement un second "coup" dans une cellule pour initialiser un cancer. (Tiré de KNUDSON, 1971).



### 1.2.2 Mutagènes et carcinogènes

Des décennies de recherche ont démontré le lien entre plusieurs substances et leur implication dans la carcinogénèse. La fumée du tabac contient plus de cinquante carcinogènes connus, dont les nitrosamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques

(KUPER et al, 2002). Le tabac cause 90% des cancers du poumon (BIESALSKI et al, 1998) et il est associé à nombreuses autres formes de cancer comme le cancer du larynx, de la tête et du cou, de l'estomac, de la vessie, du rein, de l'oesophage et du pancréas (KUPER et al, 2002). L'exposition prolongée à des fibres d'amiante est associée avec le mésothéliome (cancer de la membrane qui recouvre et protège la plupart des organes internes) (O'REILLY et al, 2007). Des sources de radiations ionisantes peuvent aussi causer le cancer. L'exposition prolongée à des radiations ultraviolettes peut mener à un mélanome et autres malignités de la peau (ENGLISH et al, 1997). Quelques cancers peuvent être causés par l'infection par certains pathogènes. Les principaux virus associés avec des cancers humains sont le virus du papillome humain, virus de l'hépatite B et de l'hépatite C, virus Epstein-Barr, virus de l'immunodéficience humaine. Des données expérimentales et épidémiologiques suggèrent que les virus pourraient être le deuxième facteur de risque le plus important pour le développement du cancer, dépassés seulement par l'usage du tabac (ZUR HAUSEN, 1991). En plus des virus, des chercheurs ont noté une relation entre les bactéries et certains cancers. L'exemple le plus remarquable est le lien entre l'infection chronique de la paroi de l'estomac par *Helicobacter pylori* et le cancer de l'estomac (PETER et BEGLINGER, 2007; WANG et al, 2007).

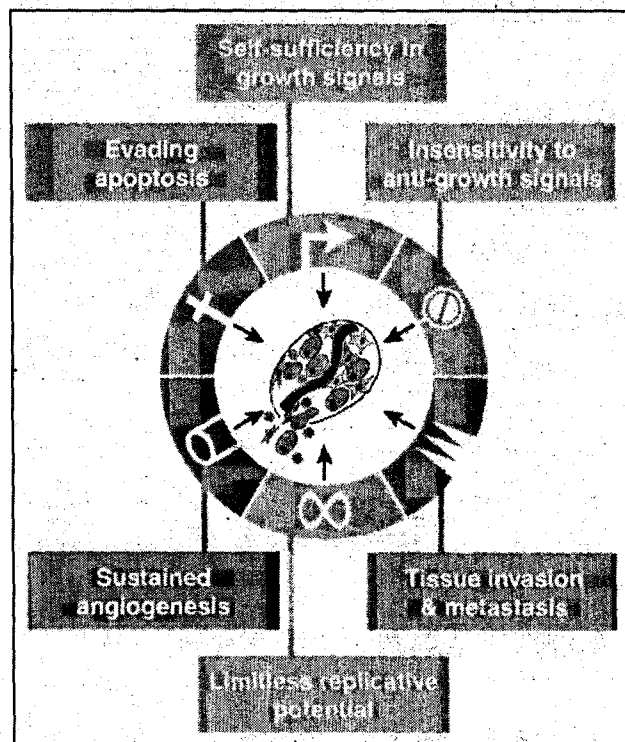
### **1.2.3 Avantages acquis par une cellule cancéreuse**

Les cellules cancéreuses ont des défauts dans les circuits qui gouvernent la prolifération cellulaire normale et le maintien des constantes du milieu intérieur de l'organisme nécessaires à son bon fonctionnement. Des altérations essentielles dans la physiologie de la cellule

peuvent collectivement dicter une croissance maligne dans presque tous les types des tumeurs humaines (HANAHAAN et WEINBERG, 2000) (Figure 2).

**Figure 2 : Les six caractéristiques nécessaires au développement du cancer.**

L'autosuffisance aux signaux de croissance (vert), l'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance (jaune), la résistance à l'apoptose (gris), l'immortalisation des cellules (bleu), l'angiogénèse (rouge) et l'invasion et la formation de métastase (mauve) ( Tiré de HANAHAAN et WEINBERG, 2000).



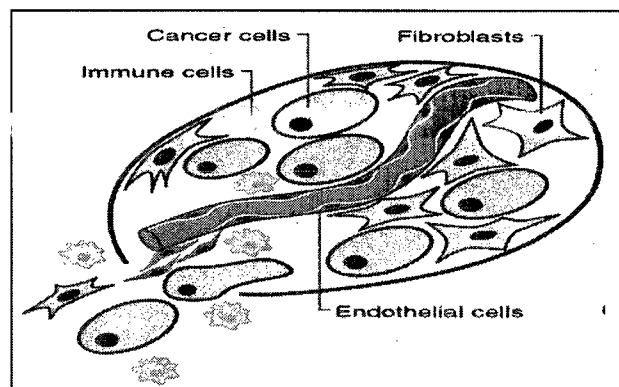
**1.2.3.1 L'autosuffisance aux signaux de croissance**

Les cellules normales requièrent des signaux de croissance tels que des facteurs de croissance solubles, des composantes de la matrice extracellulaire et des molécules

d'interactions cellule-cellule. Ces signaux sont transmis à l'intérieur de la cellule par des récepteurs transmembranaires. Beaucoup d'oncogènes peuvent se comporter comme imitateurs des signaux de croissance. Les cellules tumorales génèrent leurs propres signaux de croissance, ainsi elles réduisent leur dépendance au microenvironnement normal (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). La surexpression de récepteurs rend à la cellule cancéreuse hypersensible aux facteurs de croissance, résultant en une prolifération incontrôlée (FEDI et al, 1997). Il faut considérer les tumeurs comme un tissu complexe dans lequel il existe une interaction entre des cellules cancéreuses et différents types de cellules normales qui sont des collaborateurs actifs dans le processus néoplasique (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). (Figure 3)

**Figure 3 : Différents types de cellules retrouvés chez les tumeurs**

Interactions entre les cellules malignes altérées génétiquement et différents types des cellules normales (Modifié de HANAHAHAN et WEINBERG, 2000)



### **1.2.3.2 L'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance**

Dans un tissu normal, de multiples signaux antiprolifératif travaillent pour maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie du tissu. Ces signaux d'anticroissance cellulaire peuvent bloquer la prolifération par deux mécanismes : les cellules sont obligées de sortir de leur cycle prolifératif et d'entrer dans un état de latence (phase G0 du cycle cellulaire). De façon alternative, les cellules sont induites de manière permanente à abandonner leur potentiel prolifératif et d'entrer dans un état post-mitotique, qui est généralement associé à l'acquisition de certains caractères de différenciation cellulaire (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). De nombreuses cellules cancéreuses contiennent des gènes suppresseurs de tumeur inactivés ou déficients qui ne sont plus en mesure de contrôler ou d'arrêter le cycle cellulaire à des étapes spécifiques. L'exemple classique est la protéine du rétinoblastome (pRb), un suppresseur de tumeur qui régule négativement le cycle cellulaire en inhibant l'expression de gènes nécessaires à l'étape de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire (WEINBERG, 1995). Une stratégie pour échapper à la différenciation terminale des cellules implique la surexpression de l'oncogène *c-myc* qui encode le facteur de transcription Myc. La surexpression de Myc favorise la formation du complexe Myc - Max qui a pour fonction de détériorer la différenciation et de promouvoir la croissance (FOLEY et EISENMAN, 1999).

### **1.2.3.3 La résistance à l'apoptose**

La résistance à l'apoptose peut être acquise par les cellules tumorales à travers une variété de stratégies. La perte d'un régulateur proapoptotique par des mutations implique

nécessairement le gène suppresseur de tumeurs *p53*. L'inactivation fonctionnelle de la protéine *p53* est connue dans 50% des cancers humains et amène à la perte d'un senseur important du dommage de l'ADN induisant la cascade effectrice de l'apoptose (HARRIS, 1996).

#### **1.2.3.4 L'immortalisation des cellules**

Presque tous les types cellulaires des mammifères portent un programme intrinsèque et autonome qui limite leur multiplication. Ce programme semble fonctionner de façon indépendante des trois autres voies de signalisation cellule-cellule expliqué précédemment (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Pendant la progression tumorale, après que les cellules aient épuisé leur capacité de duplication, elles acquièrent un potentiel de réplication illimité et franchissent la barrière de la mortalité (HAYFLICK, 1997). L'activité maintenue des télomères est une caractéristique présente dans près de 90% des cancers. Les tumeurs cancéreuses acquièrent leur capacité indéfinie de réplication grâce à la surexpression de la télomérase (SHAY et BACHETTI, 1997) ou par un mécanisme alternatif et non-conservateur d'allongement des télomères (ALT), qui implique le transfert de répétitions en tandem entre les chromatides sœurs (BRYAN et CECH, 1999). La télomérase est une enzyme qui additionne des bases à la fin des télomères, permettant ainsi une multiplication illimitée des cellules descendantes.



### 1.2.3.5 L'angiogénèse

Dans le but de progresser et de prendre de l'expansion, les petites tumeurs doivent développer des habiletés en angiogénèse (BOUCK et al, 1996; HANAHAN et FOLKMAN, 1996; FOLKMAN, 1997). Cette habileté semble être acquise en étapes distinctes pendant le développement de la tumeur, via un "switch angiogénique" qui déstabilise la coordination des inducteurs et inhibiteurs de l'angiogénèse. (HANAHAN et FOLKMAN, 1996). L'altération au niveau de la transcription des gènes est une stratégie utilisée par les cellules tumorales. Beaucoup de tumeurs présentent une augmentation de l'expression de VEGF et/ou FGFs et une diminution de certains inhibiteurs comme la thrombospondin-1 ou l'interféron- $\beta$  (SINGH et al, 1995, VOLPERT et al, 1997).

### 1.2.3.6 L'invasion et la formation de métastase

Les métastases sont la cause de 90% des décès des personnes atteintes du cancer (SPORN, 1996). La capacité d'invasion et de métastases permet aux cellules de se libérer de la masse tumorale primaire et de coloniser de nouveaux tissus. Plusieurs types de protéines impliquées dans l'attachement cellule-cellule sont altérés dans ce processus : *les molécules d'adhésion cellule-cellule (CAMs)* qui incluent les membres de la famille des immunoglobulines et des cadhérines dépendantes du calcium et *les intégrines*, qui lient les cellules aux composantes de la matrice extracellulaire. Le deuxième paramètre général impliqué dans la capacité de migration et métastase entraîne les protéases de la matrice extracellulaire (COUSSENS et WERB, 1996; CHAMBERS et MATRISIAN, 1997). Certains gènes encodant des protéases

peuvent être surexprimés, des gènes inhibiteurs des protéases sont sous-exprimés et les formes inactives des protéases sont converties en enzymes actives.

### **1.3 Progression tumorale des carcinomes**

Dans la transition d'une cellule normale vers une cellule maligne, la modification des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire sont importantes pour déterminer la capacité d'invasion de la tumeur. Le stroma tumoral est un des facteurs principaux impliqués dans la progression tumoral. Les fibroblastes produisent le collagène de type IV qui enveloppe la tumeur et la laminine de la membrane basale qui supporte les cellules de l'épithélium tumoral et sépare l'épithélium des autres tissus. La membrane basale fait partie de la matrice extracellulaire et détermine la polarisation des cellules épithéliales (ABELEV et ERAISER, 2008). Un autre moyen d'interaction entre les cellules cancéreuses et la membrane basale se fait à travers de récepteurs transmembranaires spéciaux ou intégrines. Les intégrines interagissent à travers ses domaines extracellulaires et transmettent des signaux spécifiques à l'intérieur de la cellule (SCHWARTZ, 1997). Dans un grand nombre de tissus, un rôle critique dans le maintien des structures multicellulaires est assigné aux cadhérines, des molécules d'adhésion cellule-cellule homophiliques dépendantes du calcium (TAKEICHI, 1991, 1995; GUMBINER, 1996). Dans l'épithélium, ce rôle critique appartient à E-cadhérine et il est essentiel pour l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire (MCNEIL et al, 1990; NÄTHKE et al, 1993), la morphogénèse des tissus épithéliaux (WHEELLOCK et JENSEN, 1992; LARUE et al, 1996), la régulation de la

prolifération, la migration cellulaire et la mort cellulaire programmée (HERMISTON et GORDON, 1995; TAKAHASHI et SUZUKI 1996; ZHU et WATT, 1996).

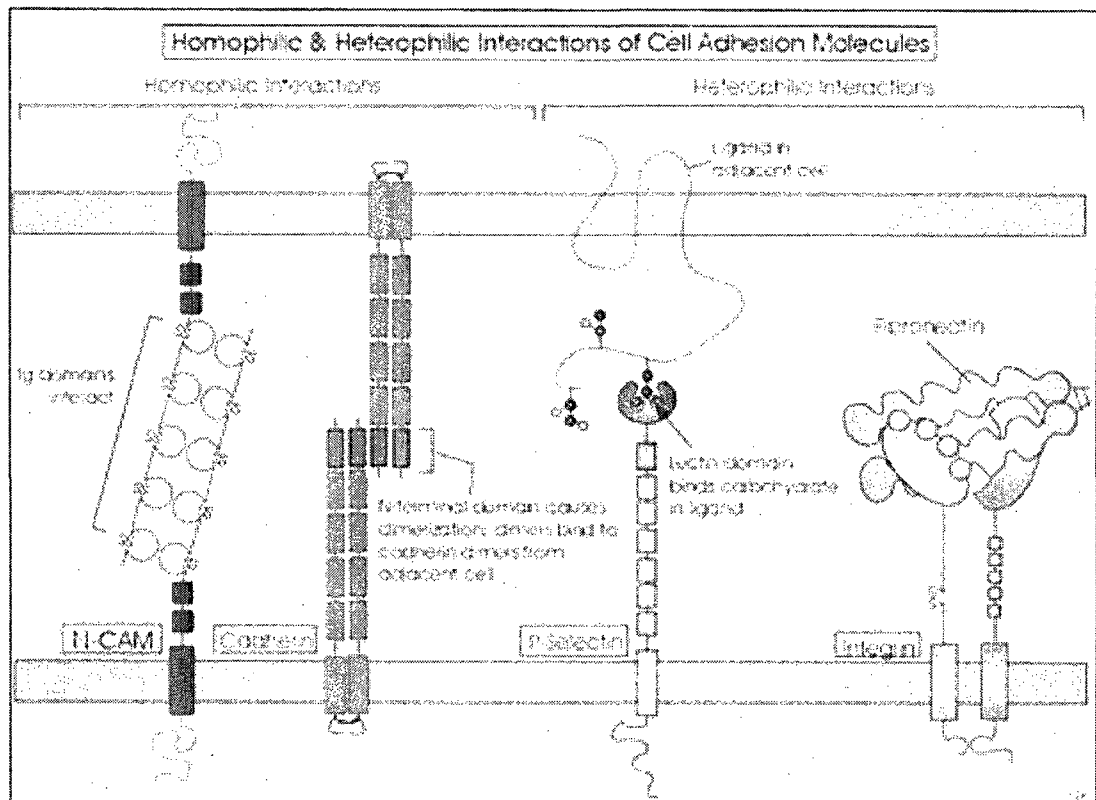
Par conséquence, la destruction de l'architecture des tissus épithéliaux et la perte de la polarité des cellules épithéliales sont les événements principaux pendant la progression tumorale d'un carcinome.

## **2. Interactions cellule-cellule**

Un seul type cellulaire peut utiliser de multiples mécanismes moléculaires pour s'associer à d'autres cellules. Dans un organisme animal multicellulaire, chaque cellule contient un assortiment de récepteurs de surface cellulaire. Ces récepteurs sont capables de répondre de façon spécifique aux molécules solubles de signalisation extracellulaire (hormones et des facteurs de croissance, par exemple) pour générer des signaux intracellulaires qui altèrent le comportement cellulaire. Également, chaque cellule dans un tissu exprime à un niveau particulier une combinaison de molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) qui lui permettent de se lier d'une façon caractéristique à d'autres cellules (*molécules d'adhésion cellule-cellule*) ou à la matrice extracellulaire (*molécules d'adhésion cellule-matrice extracellulaire*). Il existent cinq catégories majeurs de CAMs : les cadhérines, la superfamille des Immunoglobulines (Ig), les selectines, les mucines et les intégrines (Figure 4).

#### Figure 4 : Molécules d'adhésion cellulaire

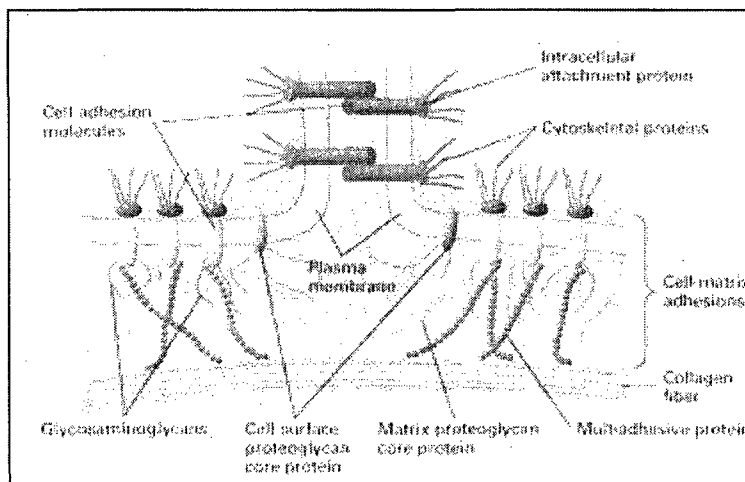
Des interactions homophiliques sont montrées par un membre de la superfamille de Immunoglobulines (N-CAM) et des cadhérines, alors que les interactions hétérophiliques sont caractéristiques des selectines et des intégrines. (Tiré de O'DAY 2006)



La *matrice extracellulaire* est un réseau complexe de protéines et d'hydrates de carbone résidant entre les cellules qui aide à maintenir les tissus. Elle est le réservoir de beaucoup d'hormones qui contrôlent la croissance et la différenciation cellulaire (LODISH et al, 2000) (Figure 5).

### Figure 5 : Adhésion cellule-matrice extracellulaire

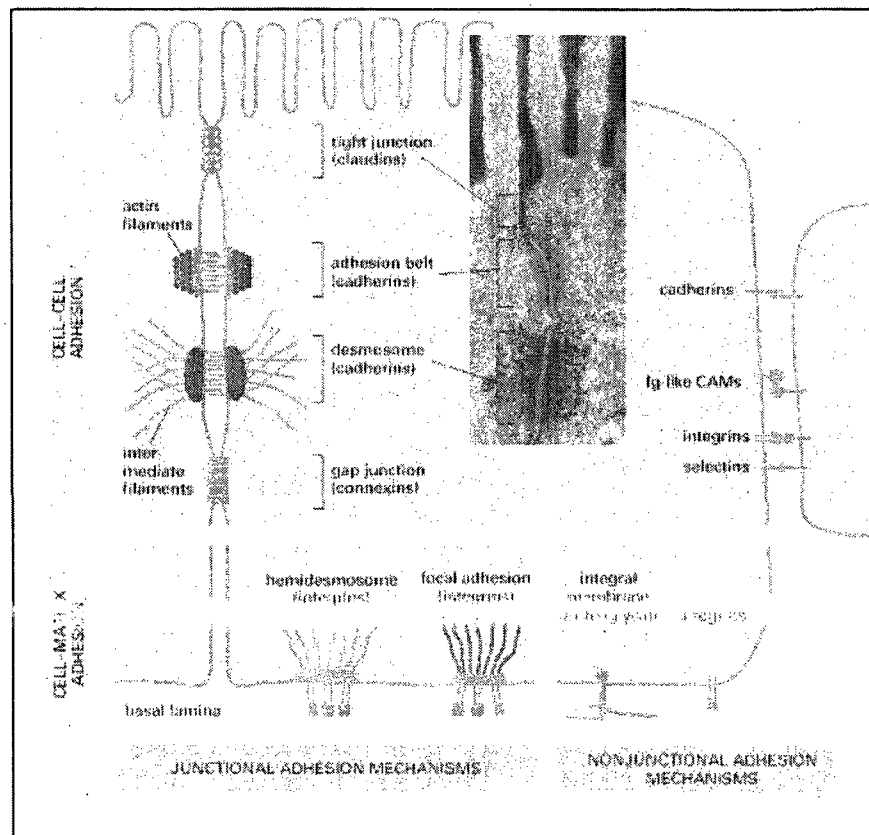
Les constituants de la matrice extracellulaire : les glycosaminoglycans, protéoglycans et glycoprotéines ont de nombreux domaines de liaison avec les cellules facilitant ainsi l'adhésion de celles-ci et leur organisation en tissu. (Modifiée de LODISH et al, 2000).



Il a été démontré que l'interaction des domaines de liaison extracellulaire des molécules de surface n'est pas suffisante pour assurer l'adhésion stable des cellules. Par exemple, les cadhérines et les intégrines s'associent par leur domaine cytoplasmique via des protéines d'ancrage avec le réseau du cytosquelette à l'intérieur de la cellule. Cette interaction est extrêmement importante pour la stabilisation des régions de contacts très spécialisés (YEH-SHIU et al, 2004). Le résultat est une structure de jonction très bien définie: un desmosome, un héli-desmosome, une adhésion focale ou une jonction adhérente, tous étant facilement identifiables par microscopie électronique (Figure 6). Dans les cellules épithéliales, le recrutement de E-cadhérine et de l'actine du cytosquelette dans les régions de contacts intracellulaires est essentiel pour la formation et la stabilisation des *jonctions adhérentes* (YONEMURA et al, 1995; YAP et al, 1997).

**Figure 6: Différents mécanismes d'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire.**

Les mécanismes jonctionnels sont montrés chez les cellules épithéliales et les mécanismes non-jonctionnels chez des cellules autres qu'épithéliales. À noter que les intégrines et les cadhérines sont impliquées autant dans les contacts jonctionnels et non-jonctionnels des liaisons cellules-cellules (cadhérines) et cellules-matrice (intégrines). La microscopie électronique montre une jonction serrée, une jonction adhérente et un desmosome. (Tiré de LODISH et al, 2000).



Les interactions cellule-cellule jouent le rôle le plus important pendant le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, et la régulation de l'architecture de tissus. La destruction des interactions cellule-cellule pendant la carcinogénese est un événement

essentiel pour l'invasion et la métastase de cellules tumorales (WILLERT et JONES, 2007; POLAKIS, 2007).

## **2.1 Les complexes de jonction : les jonctions adhérentes et les cadhérines**

L'adhésion des cellules épithéliales est contrôlée par une variété de protéines membranaires, incluant les cadhérines classiques (E, N, R-cadhérines), claudines/occludines, nectine et cadhérines desmosomales (desmoglénines, desmocollines) (Figure 6) (TAKEICHI, 1995; YAMADA et NELSON, 2007). Les cadhérines classiques sont requises pour initialiser les contacts cellule-cellule et les autres complexes protéiques assemblent en suite les jonctions serrées, qui contrôlent la diffusion paracellulaire (VAN ITALLIE et ANDERSON, 2006), alors que les desmosomes maintiennent la continuité structurale de l'épithélium (GESTIOS et al, 2006)

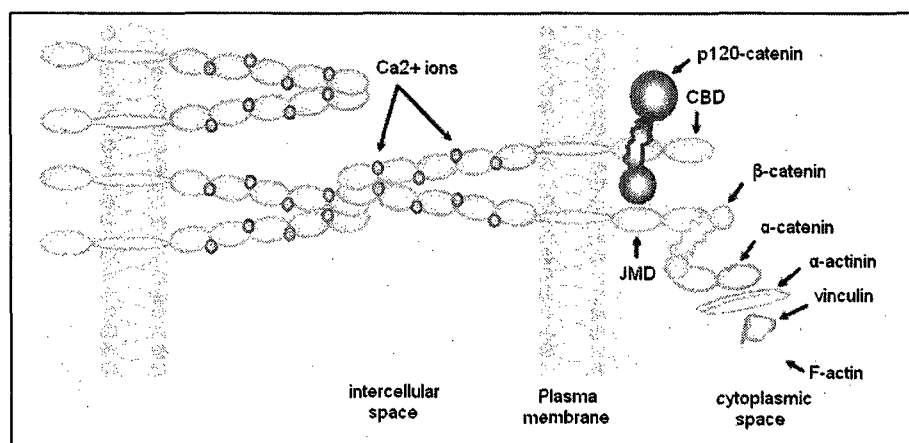
Les principales molécules d'adhésion cellule-cellule sont les *cadhérines*. Ce sont des protéines transmembranaires qui forment, en présence de  $Ca^{2+}$ , les *jonctions adhérentes*. Elles s'associent avec les microfilaments d'actine via des protéines d'ancrage cytoplasmiques (TAKEICHI, 1995). Les cadhérines mènent à l'adhésion mécanique cellule-cellule et régulent la morphologie cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (GUMBINER, 2000; GOODING et al, 2004). E-cadhérine est exprimée dans les cellules épithéliales, tandis que les jonctions adhérentes des autres tissus sont formées par les cadhérines neurales (N-cadhérine), rétinales (R-cadhérine), placentaires (P-cadhérine), endothélio-vasculaires (VE-cadhérine), etc. Les cadhérines sont synthétisées comme des

précurseurs qui subissent plusieurs modifications post-traductionnelles, incluant le clivage protéolytique. Un clivage adéquat des précurseurs est nécessaire pour la construction des dimères adhésifs (TROYANOVSKY, 2005). La molécule cadhérine, déjà incorporée à la membrane plasmique, a une région extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. La région extracellulaire des cadhérines classiques est composée de cinq domaines (EC1-EC5), chacun formé de 110 acides aminés. Il y a quatre sites de liaison pour le  $\text{Ca}^{2+}$  entre les domaines extracellulaires (NAGAFUCHI, 2001). Le domaine cytoplasmique des cadhérines est très conservé et compte un site de la liaison de la caténine-p120 (p120) juxtamembranaire et un site C-terminal pour lier la  $\beta$ -caténine. La stabilisation de la structure des jonctions adhérentes se fait grâce à la liaison des cadhérines aux filaments d'actine via la  $\beta$ -caténine, la plakoglobine et l' $\alpha$ -caténine (KEMLER, 1993 et RIMM et al, 1995) (Figure 7).



**Figure 7 : Représentation schématique du complexe cadhérines classiques-caténines.**

Les cadhérines classiques (bleu) participent à l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium (rouge). Elles sont composées d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique contient un domaine juxtamembranaire (JMD) qui lie la caténine-p120 (violet) et un domaine de liaison pour la caténine (CBD) qui lie la  $\beta$ -caténine (vert), et celle-ci lie l' $\alpha$ -caténine (orange). L' $\alpha$ -caténine,  $\alpha$ -actinine (gris) ainsi que la vinculine (rose) déterminent un lien direct entre le complexe de cadhérines-caténines et le cytosquelette d'actine (jaune) (Tiré de PAREDES et al, 2007)



**2.2 Certains rôles des cadhérines classiques dans les cellules et les tissus**

Pendant le développement embryonnaire, les cadhérines jouent un rôle important dans le processus de morphogenèse et de différenciation. Elles contrôlent, entre autres, la séparation de différentes couches de tissus (TAKEICHI, 1995), la formation des limites tissulaires (KIM et al, 2000 et TEPASS et al, 2002) et la formation de synapses entre les neurones (UCHIDA, 1996). Chez l'adulte, les cadhérines sont impliquées dans le renouvellement ordonné de certains tissus comme l'épithélium intestinal (HERMINSTON et al, 1996), la régulation des jonctions entre les cellules épithéliales et endothéliales (VENKITESWARAN et al, 2002), le

maintien d'une organisation tissulaire stable pour prévenir la dissociation et la propagation des cellules tumorales (CANO et al, 2000 et BERX et al, 1998).

### **2.3 E-cadhérine : suppresseur de l'invasion des tumeurs épithéliales**

La diminution ou la disparition de l'expression d'E-cadhérine a été reportée dans plusieurs carcinomes humains (HIROHASHI, 1998 et BERX et VAN ROY, 2001). Après la formation tumorale, l'expression diminuée d'E-cadhérine joue un rôle primordial dans la progression de la tumorigenèse en augmentant la migration et l'invasion cellulaire (STEMMLER, 2008 et PEINADO et al, 2007). Cette diminution d'expression peut être accomplie de trois façons : par répression transcriptionnelle, par mutation du gène CDH1 d'E-cadhérine ou par hyperméthylation des îlots CpG du promoteur (YOSHIURA et al, 1995 et PEINADO et al, 2004). Un rôle direct d'E-cadhérine dans la suppression de l'invasion tumorale a été démontré dans des cellules épithéliales transformées et mal différenciées où l'expression exogène d'E-cadhérine diminue significativement leur potentiel invasif et rétablit le phénotype normal (CAVALLARO et CHRISTOFORI, 2004). Dans le cas contraire, l'utilisation d'inhibiteurs d'E-cadhérine (anticorps qui altèrent sa fonction ou ARN anti-sens) rétablit l'invasion cellulaire (BEHRENS et al, 1989; FRIXEN et al, 1991 et VLEMINCKY et al, 1991). Une étude de tumorigenèse pancréatique, utilisant un modèle des souris transgéniques, a permis de démontrer que l'adhésion cellulaire médiée par E-cadhérine est cruciale pour prévenir la progression d'un adénome bien différencié à un carcinome invasif (PERL et al, 1998). Toutes ces données appuient l'importance d'E-cadhérine dans

l'inhibition de l'invasion et la formation de métastases aux stades avancés du développement tumorale.

Bien que le rôle de E-cadhérine dans la régulation de l'invasion tumorale soit bien établi, le mécanisme exact de son activité de suppression de l'invasion est moins bien défini. Il existe une combinaison de mécanismes possibles. Parmi ceux-ci, on note une diminution de l'adhésion et du nombre de jonctions cellulaires et l'altération de l'organisation du cytosquelette. On compte aussi le changement des voies de signalisation (modulation de la signalisation par des récepteurs à tyrosine kinase, activation de la cascade de Wnt/ $\beta$ -caténine ou la signalisation de RhoGTPase) qui mènent à la dépolarisation des cellules et au gain de propriétés migratoires (CAVALLARO et CHRISTOFORI, 2004 et CAVALLARO et al, 2002).

Lors de la progression tumorale, les cellules épithéliales subissent une transformation épithélio-mesenchymateuse. Lors de cette transformation, les cellules acquièrent un phénotype semblable aux fibroblastes, une capacité de dissociation les unes des autres et de migration. Ces événements sont les fondements pour l'invasion et la progression métastatique des cellules malignes. La destruction des contacts cellule-cellule résultant de la diminution de l'expression d'E-cadhérine joue le rôle le plus important dans cette transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (THIERY, 2002 et GLOUSHANKOVA, 2008)

### **3. Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est une série ordonnée d'événements pendant lesquels les cellules épithéliales perdent beaucoup de leurs caractéristiques épithéliales et prennent des propriétés typiques des cellules mésenchymateuses (THIERY et SLEEMAN, 2006). Ce processus implique des changements complexes inter- et intracellulaires dans l'architecture et le comportement de la cellule : la dissociation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire, la réorganisation du cytosquelette pour conférer à la cellule la capacité de déplacement à travers de la matrice extracellulaire et l'induction d'un nouveau programme transcriptionnel pour maintenir ce phénotype mésenchymateux (RADISKY, 2005). Le spectre exact des changements qui se produisent pendant l'EMT est probablement déterminé par l'intégration des signaux extracellulaires que la cellule reçoit (THIERY et SLEEMAN, 2006) (Tableau 1) (Figure 8).

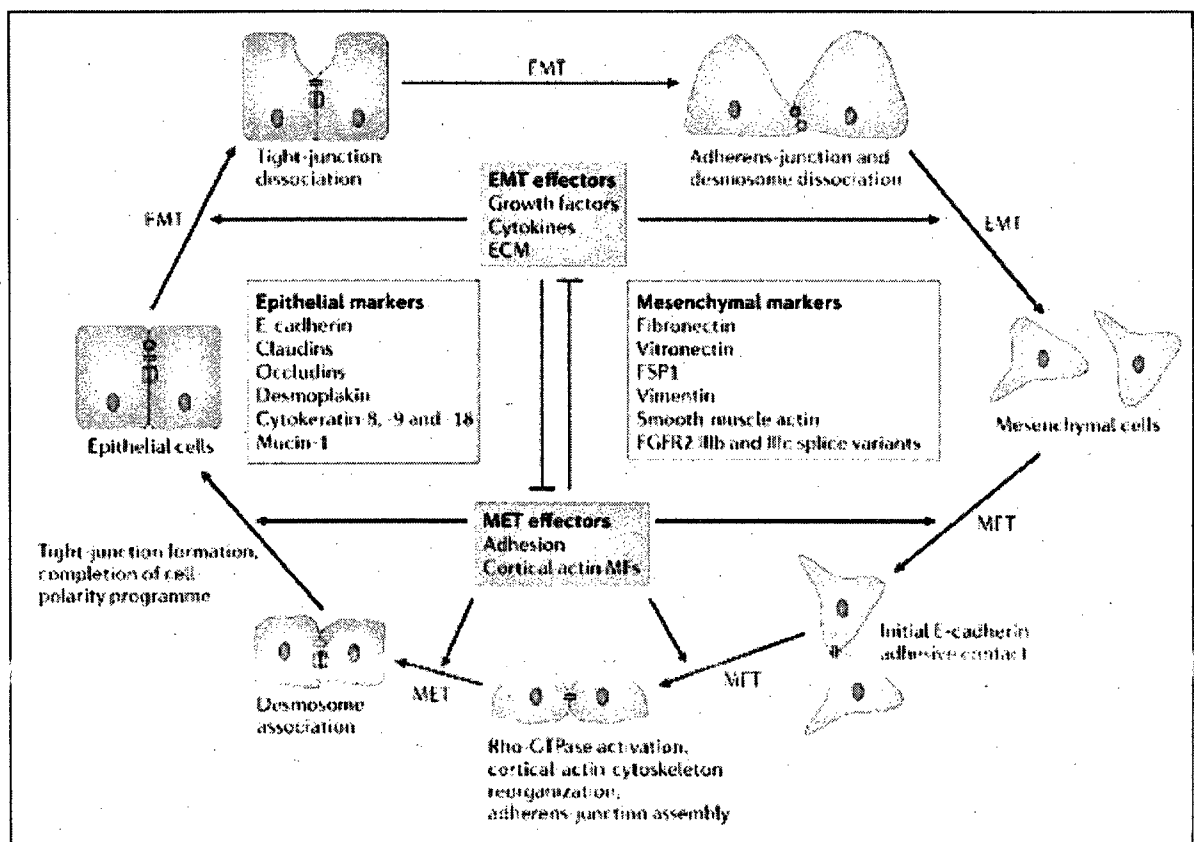
**Tableau 1 : Les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.**

(Tiré de LEE et al, 2006)

<b>Proteins that increase in abundance</b>	<b>Proteins whose activity increases</b>
N-cadherin	ILK
Vimentin	GSK-3 $\beta$
Fibronectin	Rho
Snail-1 (Snail)-2 (Slug)	
Twist	<b>Proteins that accumulate in the nucleus</b>
FOXC2	$\beta$ -catenin
MMP-2-3-9	Smad-2/3
Integrin $\alpha\beta$ 6	NF- $\kappa\beta$
<b>Proteins that decrease in abundance</b>	Snail-1 (Snail)-2 (Slug)
E-cadherin	Twist
Desmoplakin	<b>In vitro functional markers</b>
Cytokeratin	Increased migration
Occludin	Increased invasion
	Increased scattering
	Elongation of cell shape
	Resistance to anoikis

### Figure 8 : Le cycle de plasticité des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales sont transformées en cellules mésenchymateuses et vice versa par un cycle d'événements. Les différentes étapes pendant l'EMT et son processus inverse, la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET), sont régulées par des effecteurs d'EMT et de MET. La figure montre les modifications des jonctions serrées et des jonctions adhérentes qui se produisent pendant la progression de l'EMT et de la MET. Certains marqueurs caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymateuses sont indiqués. (Tiré de THIERY et SLEEMAN, 2006)



### 3.1 Caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymateuses

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses représentent deux des types cellulaires les plus importants chez les mammifères. Elles diffèrent en plusieurs fonctions et caractéristiques

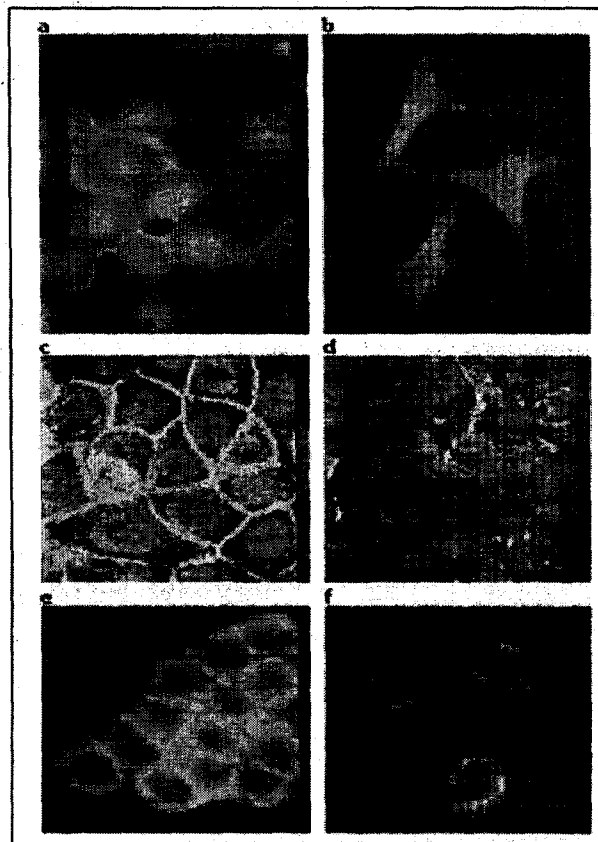
phénotypiques. Les *cellules épithéliales* sont caractérisées par : (i) des interactions cohésives parmi les cellules, qui facilitent la formation de couches cellulaires contiguës; (ii) l'existence de deux domaines membranaires : apical, et basolatéral; (iii) la présence de jonctions serrées et adhérentes entre leurs domaines apical et latéral; (iv) la distribution apicale-basolatérale ou polarisée de certains organelles et de composantes du cytosquelette (LARUE et BELLACOSA, 2005) (Figure 9). Dans des circonstances normales, les cellules épithéliales peuvent être mobiles mais elles restent toujours dans la couche épithéliale. In vitro, elles poussent en groupe de cellules. (SCHOCK et PERRIMON, 2002 et THIERY et SLEEMAN, 2006). Les épithéliums extérieurs (l'épiderme, par exemple) servent de barrière protectrice contre les dangers environnementaux et les épithéliums intérieurs (l'épithélium simple dans l'appareil digestif, l'endothélium, par exemple) créent des sous-structures bien définies dans l'organisme (RADISKY, 2005).

Les *architectures mésenchymateuses multicellulaires* sont caractérisées par: (i) une perte ou absence d'interactions entre les cellules, donc, il n'y a pas formation de couches cellulaires contiguës; (ii) une absence des membranes apicale et latérale; (iii) absence de polarisation des molécules de surface cellulaire et du cytosquelette d'actine (LARUE et BELLACOSA, 2005). In vitro, les cellules mésenchymateuses ont un aspect fusiforme, une morphologie semblable à un fibroblaste, elles poussent de façon dispersée et elles sont très mobiles. (THIERY et SLEEMAN, 2006) (Figure 9). Elles organisent et remodelent la matrice extracellulaire par la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) et sont une source importante des protéines de signalisation comme des facteurs de croissance

épithéliaux (EGF), hépatocytaires (HGF) et fibroblastiques (FGF) et facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (RADISKY, 2005).

**Figure 9 : Images de la Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**

Des cellules mammaires SCp2 (a) ont été traitées avec MMPs-3 (b) pour induire une EMT. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-phalloïdine pour visualiser les microfilaments d'actine (rouge) et avec DAPI pour l'ADN (bleu). Des cellules mammaires Eph4 (c) ont été traitées avec TGF- $\beta$  (d) pour induire une EMT. Les cellules ont été marquées avec les anticorps anti-E-cadhérine (vert) et anti-vimentine (rouge). L'EMT a été observée dans des cellules de carcinome de vessie de rat NBT-II. Lors de la pré-EMT, les cellules ont été marquées avec l'anticorps anti-desmoplakine pour visualiser les desmosomes (e) et en post-EMT, avec l'anticorps anti-vimentine (f). (Tiré de THIERY et SLEEMAN, 2006).





### 3.2 L'importance du processus d'EMT

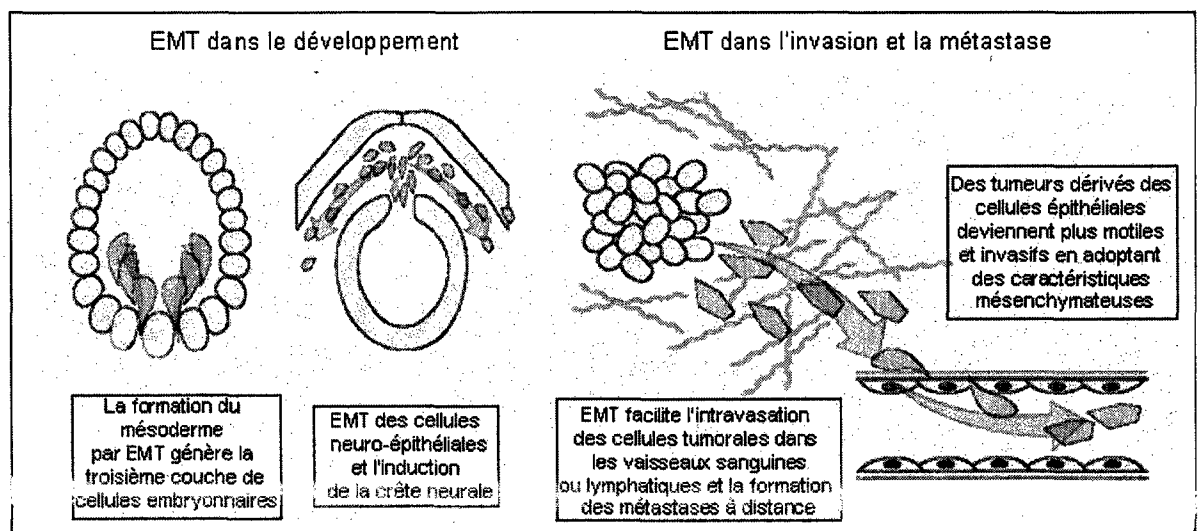
La transition épithélio-mésenchymateuse joue un rôle très important dans plusieurs étapes du développement, comme la gastrulation, le délaminage de la crête neurale, etc. (NIETO, 2001 et SHOOK et KELLER, 2003) (Figure 10). Le processus inverse, connu comme transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) a aussi été rapporté pendant le développement des reins, la formation de la cavité coelomique, etc. (CHRIST et ORDAHL, 1995 et NIETO, 2002).

L'induction de l'EMT assure l'intégrité mécanique et physiologique des tissus, mais une induction inappropriée de ce processus peut avoir des conséquences dramatiques. Une inflammation chronique ou des conditions qui favorisent une destruction soutenue du tissu peuvent stimuler la fibrose. Dans un cas de fibrose, il y a un excès d'EMT qui altère l'intégrité du tissu et de sa fonction (IWANO et al, 2002 et KALLURI et NEILSON, 2003). En plus, les caractéristiques des cellules aptes à faire une EMT, comme leur habilité à se séparer des cellules avoisinantes et à pénétrer d'autres tissus, sont spécialement dangereuses quand elles sont acquises par des cellules tumorales. Ces caractéristiques sont impliquées dans l'étape de métastase tumorale (KANG et MASSAGUE, 2004 et YANG et al, 2003) (Figure 10). L'EMT collabore aussi dans la progression tumorale en donnant une augmentation de la résistance aux agents pro-apoptotiques (MAESTRO et al, 1999 et VEGA et al, 2004) et en produisant des tissus de support pour les tumeurs (PETERSEN et al, 2003).

Il existe une différence majeure entre l'EMT du développement normal et l'EMT des processus pathologiques. Pendant le développement normal, les événements cellulaires et moléculaires suivent un plan spatial et temporel hautement régulé, tandis que pendant la progression métastatique par exemple, l'ordre des événements est chaotique, indépendant du temps et certains événements peuvent être évités (LARUE et BELLACOSA, 2005).

**Figure 10 : EMT dans le développement, l'invasion et la métastase.**

(Modifié de RADISKY, 2005).



### 3.3 Événements moléculaires qui régulent l'EMT

L'interaction de différents facteurs de croissance et des cytokines sécrétés par les cellules cancéreuses et les cellules hôtes, en relation avec des changements dans le microenvironnement local, contribuent à déclencher les événements moléculaires associés avec le programme EMT pendant la progression du cancer (BISSEL et RADISKY, 2001;

TSO et al, 2006; GOTZMANN et al, 2004 et YANG et al, 2006). Particulièrement, l'expression augmentée de plusieurs facteurs de croissance comme TGF- $\beta$ , FGF, EGF, HGF et les ligands de Wnt initialisent une signalisation dépendante de leurs récepteurs et produisent une activation des molécules effectrices intracellulaires : membres de la famille des petites GTPases (Ras, Rho et Rac) et les membres de la famille de la tyrosine-kinase Src. Ces effecteurs organisent le désassemblage des complexes de jonctions et les changements du cytosquelette qui se produisent pendant l'EMT. L'activation de ces voies de signalisation provoque aussi l'activation des régulateurs transcriptionnels comme Snail et Slug, lesquels contrôlent les patrons d'expression des gènes caractéristiques de l'EMT. (BARALLO-GIMENO et NIETO, 2005). La cible principale de ces régulateurs transcriptionnels est la répression du gène d'E-cadhérine. La diminution de l'expression d'E-cadhérine (ou sa mutation chez les cellules cancéreuses) a des conséquences sérieuses et importantes pour l'EMT. Les niveaux d'E-cadhérine deviennent limités, ce qui entraîne par conséquence une perte des complexes de jonctions intercellulaires dépendantes d'E-cadhérine et l'abolition de la séquestration de  $\beta$ -caténine au cytoplasme. Comme résultat,  $\beta$ -caténine se relocalise au noyau et stimule la voie de signalisation de Wnt . (THIERY et SLEEMAN, 2006).

L'activité de la kinase glycogène-synthétase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) est inhibée par la voie de la protéine kinase B (AKT/PKB) et la voie Wnt et Hedgehog qui régulent l'EMT. (POLAKIS, 2000 et GRILLE et al, 2003). GSK3 $\beta$  est capable de phosphoryler plusieurs facteurs de transcription comme : p53, Myc, facteur nucléaire de cellules T activées (NFAT), qui causent son exportation du noyau. (BEALS et al, 1997). GSK3 $\beta$  phosphoryle Snail-1 et l'amène à son ubiquitination et sa dégradation et à l'exportation de Snail-1 du noyau (ZHUO et al,

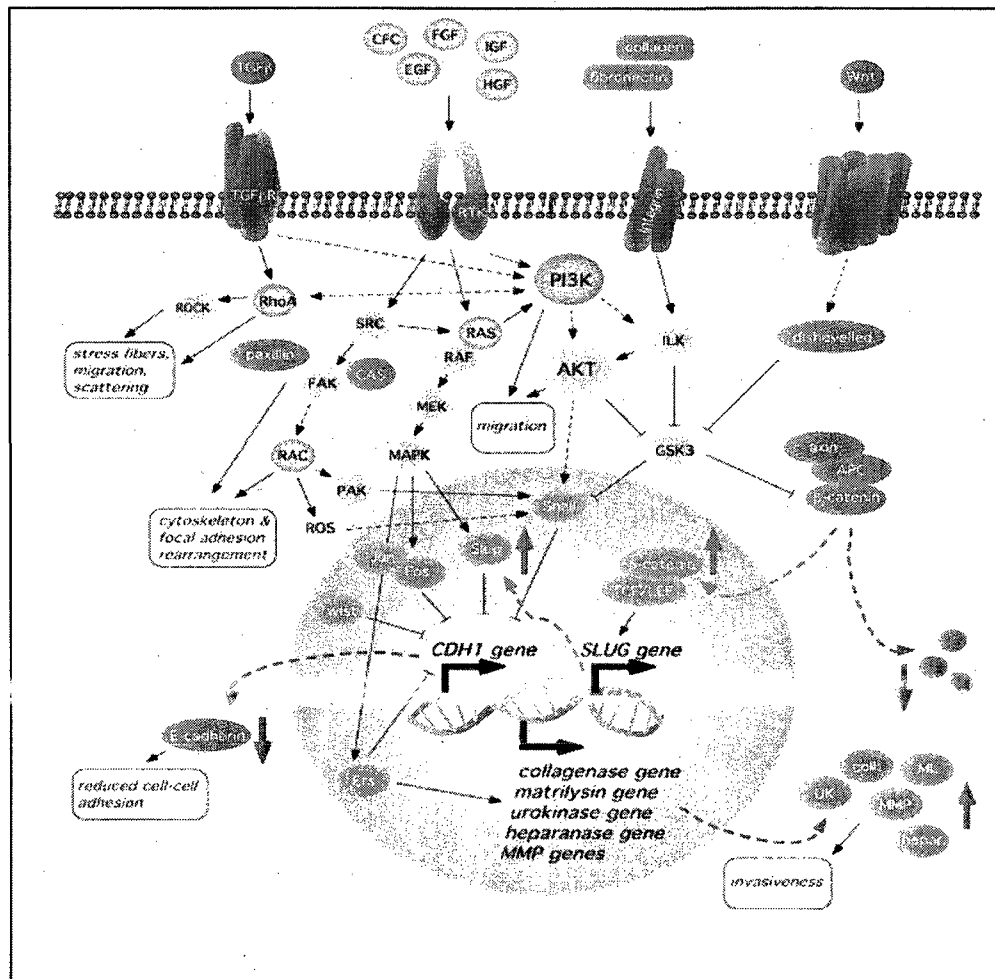
2004). Des mutations de Snail-1 préviennent sa phosphorylation par GSK3 $\beta$ , Snail-1 reste donc stable et se localise au noyau où il induit l'EMT. Comme on peut s'y attendre, l'inhibition de l'activité de GSK3 $\beta$  donne une augmentation des niveaux cellulaires de Snail-1 et par conséquent une diminution de la régulation d'E-cadhérine.

La stimulation de la signalisation du récepteur de facteur de croissance épithéliale (EGFR) se fait par ses ligands. Ces ligands sont EGF, TGF- $\beta$ , le facteur de croissance ressemblant à l'EGF et se liant à l'héparine (HB-EGF) et l'amphiréguline. Via des boucles autocrines et paracrines, cette stimulation conduit à l'activation de plusieurs protéines : Src, la protéine kinase mitogène-activée (MAPK), la kinase phosphatidylinositol-3 (PI3K)/Akt, le facteur nucléaire-kappaB (NF-kB), la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) et la cascade intracellulaire de  $\beta$ -caténine. Elle mène aussi à l'augmentation de la régulation des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMPs) et à l'expression de l'activateur de la urokinase plasminogène (uPA) (MIMEAULT et BATRA, 2006-1; MIMEAULT et BATRA, 2006-2; MIMEAULT et al, 2003). Toutes ces conséquences contribuent à la croissance soutenue, la survie, les arrangements du cytosquelette, les changements de la polarité cellulaire, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Plus spécifiquement, plusieurs études indiquent que l'activation de la signalisation d'EGFR provoque la dispersion cellulaire par la désorganisation des jonctions adhérentes et desmosomales et la migration via l'activation des voies Raf/MAPK, Rac et/ou PLC $\gamma$  (SAVAGNER, 2001 et EDME et al, 2002). Il a aussi été démontré que EGF mène à l'activation de MAPK et de la cascade de kinases liées aux intégrines (ILK)/PI3K/Akt et l'augmentation de l'activité de MMP-2 et -9 chez les cellules épithéliales de la surface ovarienne, reconnues comme étant des précurseurs du carcinome

ovarien (AHMED, 2006). Par conséquence, il peut se produire une induction ou une augmentation de la migration des cellules et leur donner une morphologie ressemblant à celle des fibroblastes (expression de vimentine, switch de E-cadhérine à N-cadhérine) (LARUE et BELLACOSA, 2005 et LEE et al, 2006) (Figure 11).

**Figure 11 : Schématisation des voies de signalisation associées à l'EMT**

Différents ligands se lient aux récepteurs de tyrosine kinase (RTK), aux récepteurs de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R) ou aux récepteurs des intégrines. L'activation de molécules structurales de différentes voies de signalisation et de facteurs de transcription mène à des changements dans l'adhésion cellulaire, des réarrangements du cytosquelette et l'induction des gènes spécifiques qui favorisent l'exécution du programme d'EMT. (Tiré de LARUE et BELLACOSA, 2005)



En plus de la dissociation des adhésions cellule-cellule, les cellules qui subissent une EMT doivent réguler les contacts des intégrines avec la matrice extracellulaire. Il existe plusieurs connexions entre la signalisation des intégrines et les autres voies qui contrôlent l'EMT. Par

exemple, l'endocytose d'E-cadhérine implique l'activation de Rap1, une petite GTPases qui régule l'activation cytoplasmique des intégrines nécessaires pour la formation des adhésions focales (BALZAC, 2005). La liaison des composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine à l'intégrine- $\beta$ 1 ou  $\beta$ 3 des cellules malignes mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation incluant des protéines comme Ras, Rac, PI3K, ILK,  $\beta$ -caténine et/ou PLC $\gamma$ . Ces molécules contribuent à la prolifération et survie des cellules cancéreuses et au développement des cancers localement invasifs et métastatiques (MENKE et al, 2001 et JONES et al, 2005).

Comme expliqué auparavant, l'accomplissement complet de l'EMT exige l'activation d'un programme génétique complexe. Il s'agit d'événements transitoires pendant la progression tumorale et seulement certaines cellules tumorales répondent aux signaux inducteurs de l'EMT. En effet, l'intérêt de l'EMT dans les tumeurs humaines est encore un sujet de discussion considérable qui attend une clarification et le développement de modèles *in vivo* appropriés ainsi que des études plus approfondies sur les tumeurs humaines.

#### **4. Le cancer de l'ovaire**

Malgré les avancements des trois dernières décennies dans la chirurgie de réduction tumorale et la chimiothérapie combinée, le cancer de l'ovaire reste une menace considérable pour les femmes. Il est actuellement le cancer gynécologique le plus mortel et la cinquième cause de mortalité par cancer chez les femmes. Mondialement, on estime à 204 000 nouveaux cas diagnostiqués et 125 000 décès dus au cancer ovarien chaque année

(SANKARANARAYANAN et FERLAY, 2006). Au Canada, près de 2 500 cas ont été diagnostiqués et 1 700 décès constatés en 2008 (Canadian Cancer Statistics, 2008). Le pourcentage de survie après 5 ans a passé de 37% dans les années 70 à 45% dans les années 90 (JEMAL et al, 2006). Cependant, la survie des femmes avec une maladie avancée ne s'est pas améliorée de façon significative et la majorité des patientes succombent à la maladie. Seulement 25% de tous les cas sont diagnostiqués en stade I, stade précoce où la croissance tumorale est limitée aux ovaires, et 90% de ces patientes peuvent être traitées avec un traitement chirurgical et une chimiothérapie adéquate. Par contre, seulement 30% ou moins des patientes en stades III ou IV (tumeur impliquant 1 ou 2 ovaires avec implants péritonéaux hors de la région pelvienne et/ou métastases) peuvent être guéries (BAST et al, 2007). Le risque de développer un cancer ovarien dans la vie d'une femme est de 1 sur 70 en comparaison à 1 sur 8 ou 9 pour le cancer de sein. La plus grande mortalité parmi tous les cancers gynécologiques est associée au cancer de l'ovaire. Ceci reflète le diagnostic tardif de la maladie, le manque de tests de dépistages adéquats et le développement d'une résistance à la chimiothérapie par les cellules cancéreuses.

#### **4.1 Facteurs de risques associés au cancer de l'ovaire**

Selon des études épidémiologiques, l'histoire familiale est le facteur de risque le plus important pour le développement du cancer de l'ovaire (AUERSPERG et al, 2001). Parmi les facteurs de risques génétiques associés aux cancers ovariens héréditaires, les mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 sont particulièrement importantes (LYNCH et al, 1998). L'incidence du cancer de l'ovaire est plus grande parmi les femmes de race caucasienne et



les femmes post-ménopausiques. L'âge avancé (plus de 50 ans) au moment du diagnostic, contribue à une mortalité très élevée associée à la maladie. Les ovaires des femmes post-ménopausiques forment typiquement de profonds plis, des invaginations et des kystes d'inclusion sous-jacents à la surface épithéliale de l'ovaire (AUERSPERG et al, 1998 et 2001). Ces changements apportent un microenvironnement particulier où la présence de facteurs stimulants favorisent la progression tumorale (FEELEY et WELLS, 2001). D'autres facteurs de risque comme la nulliparité (aucune grossesse), l'utilisation de drogues pour traiter l'infertilité et certains désordres endocriniens augmentent le risque de cette maladie (HOLSCHNEIDER et BEREK, 2000). Le risque de cancer de l'ovaire augmente aussi avec le nombre d'événements ovulatoires. Les blessures et l'inflammation répétitive de la surface épithéliale de l'ovaire associée à l'ovulation contribuent à augmenter la prolifération cellulaire et le taux de mutations favorisant la tumorigenèse (FEELEY et WELLS, 2001 et OZOLS et al, 2004). Par contre, la multiparité (plusieurs grossesses), l'utilisation de contraceptifs oraux, les grossesses et la lactation sont associés à un faible risque de cancer ovarien, à cause de la diminution du nombre de cycles ovulatoires (AUERSPERG et al, 2001 et DALY et OBRAMS, 1998).

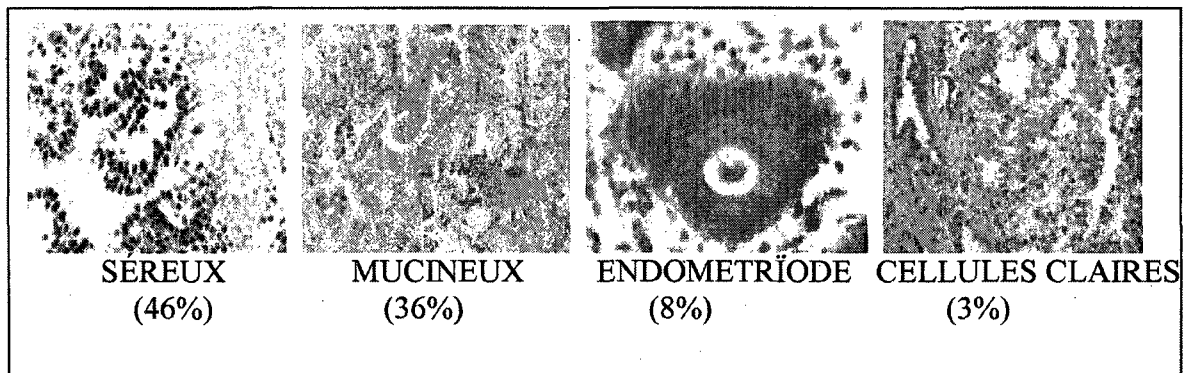
Environ 90% des cancers de l'ovaire sont des néoplasies clonales qui résultent d'une simple cellule progénitrice épithéliale ayant subi de multiples altérations génétiques et épigénétiques (JACOBS et al, 1992). Ces altérations génétiques sous-jacentes pourront apparaître suite à des mutations spontanées survenant lors de la réparation des défauts de l'ovulation ou après la stimulation avec des gonadotrophines ou des androgènes (BAST et al, 2007). La transformation maligne a été associée à l'activation des voies de signalisation de PI3K,

Ras/MAP/Src et STAT3, la perte de fonction de p53 et de gènes suppresseurs de tumeurs, l'expression de facteurs stimulants l'angiogénèse (VEGF, FGF) et l'augmentation de l'expression de mucines (MUC1 et CA125) (MILLS et al, 2001; PATTON et al, 1998; NISHIMOTO et al, 2005; BERCHUCK et al, 1994; DOWDY et al, 2005; YONEDA et al, 1998; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al, 1999 et BAST et al, 1981).

#### **4.2 Classification du cancer de l'ovaire**

Il existe trois types principaux de tumeurs ovariennes : tumeurs de cellules germinales (3%), tumeurs du stroma (5%) et tumeurs épithéliales (90%). Les tumeurs épithéliales peuvent être bénignes, de bas potentiel de malignité ou des carcinomes malins. Plusieurs investigations suggèrent que le carcinome épithélial de l'ovaire se développe à partir de la couche simple de cellules épithéliales qui recouvre l'ovaire ou à partir des kystes d'inclusion situés juste en dessous de la surface ovarienne (AUERSPERG et al, 2001; MURDOCH, 1996 et MURDOCH et al, 2001). Ce carcinome peut adopter une différenciation séreuse (46%), mucineuse (36%), endométrioïde (8%) ou des cellules claires (3%) (Figure 12).

**Figure 12 : Types histologiques du carcinome épithélial de l'ovaire**



Le carcinome ovarien peut métastaser via les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, mais de façon caractéristique, il se dissémine plus fréquemment dans la cavité péritonéale et forme des nodules ou des agrégats de cellules cancéreuses qui tapissent les surfaces séreuses. Le blocage du système lymphatique du diaphragme et la fuite de fluides riches en protéines à partir des vaisseaux sanguins tumoraux produisent l'ascite (NAORA et MONTELL, 2005).

#### **4.3 Présentation clinique, diagnostic et traitement du cancer ovarien**

Bien que le cancer de l'ovaire soit considéré comme très silencieux, cette maladie est généralement symptomatique surtout dans les stades plus avancés (GOFF et al, 2000). Cependant, les symptômes ne sont pas spécifiques et ils sont généralement attribués à des conditions gastro-intestinales, génito-urinaires, gynécologiques bénignes ou des muscles squelettiques. Quatre-vingt-neuf pourcent des patientes avec une maladie limitée aux ovaires (stade I), ou au pelvis (stade II) et 97% des patientes avec une maladie propagée à l'abdomen (stade III) ou plus loin de l'abdomen (stade IV) signalent une douleur abdominale, un

ballonnement, une gêne pelvienne, et une augmentation de la fréquence urinaire. Souvent, le cancer ovarien se présente à un stade avancé avec une grande distension abdominale, de l'ascite et une masse adnexale palpable à l'examen physique et visible à l'échographie transvaginale ou à la tomographie axiale abdomino-pelvienne (BAST et al, 2007). Le diagnostic définitif du cancer de l'ovaire exige généralement une laparoscopie ou une laparotomie. La concentration sérique de CA125 ou MUC16 est élevée chez 80% des patientes avec un cancer épithélial de l'ovaire avancé et elle est utilisée de façon quotidienne pour son diagnostic (CHAUHAN et al, 2006). L'intervention chirurgicale (salpingo-oophorectomie, hystérectomie abdominale totale, omentectomie ou chirurgie de réduction tumorale) est le traitement de préférence pour enlever le plus possible de la tumeur. En phase postopératoire, une chimiothérapie de six cycles avec carboplatin et paclitaxel est souvent utilisée (BEREK et BAST, 2006). Il est aussi possible d'ajouter une chimiothérapie intra-péritonéale (ARMSTRONG et al, 2006). La radiothérapie est une autre option de traitement surtout pour les patientes résistantes à la chimiothérapie (CMELAK et KAPP, 1997 et BROWN et al, 2005).

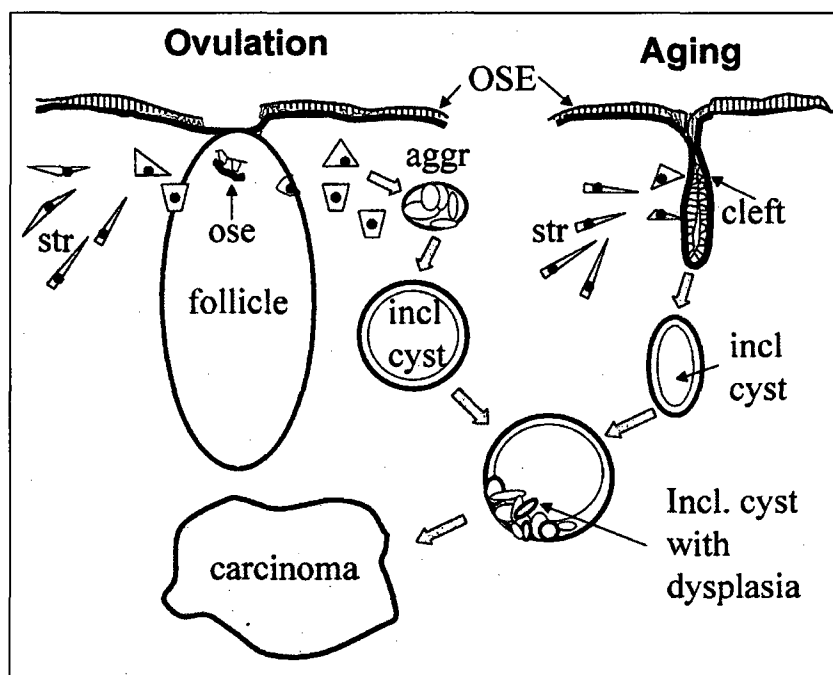
#### **4.4 Processus d'EMT dans la physiologie des ovaires, développement et progression tumorale**

La surface épithéliale de l'ovaire (OSE) est une couche simple de cellules aplaties supportée à la surface de l'ovaire par la membrane basale et la tunique albuginée. L'intégrité de cet épithélium est maintenue par des desmosomes, des jonctions serrées, des intégrines et des cadhérines. Cette couche de cellules épithéliales a la capacité de modifier son stade de

différenciation (phénotype stromal ou épithélial) en réponse à des signaux environnementaux. Pendant le processus de réparation post-ovulatoire, les cellules d'OSE subissent une EMT et atteignent des caractéristiques semblables aux fibroblastes (SALAMANCA et al, 2004). L'EMT facilite la libération des cellules d'OSE retenues dans le stroma de l'ovaire pendant l'ovulation (AHMED et al, 2006). Il a été aussi proposé qu'une défaillance du programme d'EMT dans ces conditions pourrait mener à l'agrégation de cellules épithéliales (cellules OSE) dans le stroma et la formation de kystes d'inclusion, des sites communs pour l'initiation du cancer ovarien (Figure 13). Des facteurs de croissance comme EGF, FGF, TGF $\beta$ , collagène et des cytokines ont un accès facile, et en plus grande concentration, aux cellules de l'OSE à l'intérieur des kystes d'inclusion où ils augmentent la prolifération, la dispersion cellulaire, induisent une EMT et la transformation néoplasique de ces cellules. Ce processus doit être distingué de l'EMT de carcinomes ovariens avancés, dans lequel le programme d'EMT augmente la capacité de migration et d'invasion.

### Figure 13 : Progression néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire (OSE)

La figure montre deux voies par lesquelles l'OSE est retenu dans le stroma ovarien. Les cellules de l'OSE restent épithéliales, se regroupent (*aggr*) et forment des kystes d'inclusion (*incl cyst*); des sites préférentiels favorisant les changements métaplasiques et dysplasiques qui mènent à la tumorigenèse (Tiré de AUERSPERG et al, 2001).



### 5. Glycoprotéines multifonctionnelles: les mucines

Les mucines sont des biomolécules de haut poids moléculaire produites par les cellules épithéliales qui recouvrent l'intérieur des organes creux ou tubulaires du corps humain. Le rôle principal des mucines est de maintenir les surfaces épithéliales hydratées. Cette hydratation permet la lubrification et le fonctionnement adéquat des voies respiratoires et digestives. En plus, les mucines sont impliquées dans la protection des cellules épithéliales contre les infections et les traumatismes (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Elles

ont aussi un rôle très important dans le renouvellement et différenciation des épithéliums, la modulation de l'adhésion cellulaire, la signalisation et l'immunosuppression (WESSELING et al, 1995; CARRAWAY et al, 2003; KNOWLES et BOUCHER, 2002 et SINGH et al, 2007). Une particularité structurale de toutes les mucines est la présence d'une grande région centrale formée de multiples séquences répétées "en tandem" de 10 à 80 fois, parmi lesquelles, jusqu'à la moitié des acides aminés sont des sérines ou des thréonines. Cette zone finit par se saturer de centaines d'oligosaccharides à liaison O. Dix-huit gènes encodant des mucines humaines ont été identifiés à ce jour: *MUC1*, *MUC2*, *MUC3A*, *MUC3B*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6*, *MUC7*, *MUC8*, *OVGP1 (MUC9)*, *MUC11/12*, *MUC13*, *MUC15*, *MUC16 (CA125)*, *MUC17*, *MUC19* et *MUC20* (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Ces mucines sont regroupées en deux catégories selon leurs caractéristiques structurales et leurs rôles physiologiques : mucines sécrétées et mucines liées à la membrane.

Les mucines sécrétées produisent la plupart du mucus et sont exprimées par des cellules épithéliales spécialisées. Elles ont été divisées en deux grands sous-types : les mucines formant du gel (*MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6*, et *MUC19*) et les mucines qui ne font pas de gel (*MUC7*) (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Le volume et la composition de la matrice du gel sont déterminés par le type de mucines, la nature de ses modifications post-traductionnelles, le degré de ses liaisons intramoléculaires et intermoléculaires et le type de molécules qui sont captées dans le gel (GENDLER et SPICER, 1995; HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004 et GURURAJA et al, 1998). Le gel forme une barrière et protège l'épithélium des voies aériennes et digestives des microorganismes, des toxines, des acides, des protéases et d'autres enzymes digestives. Une

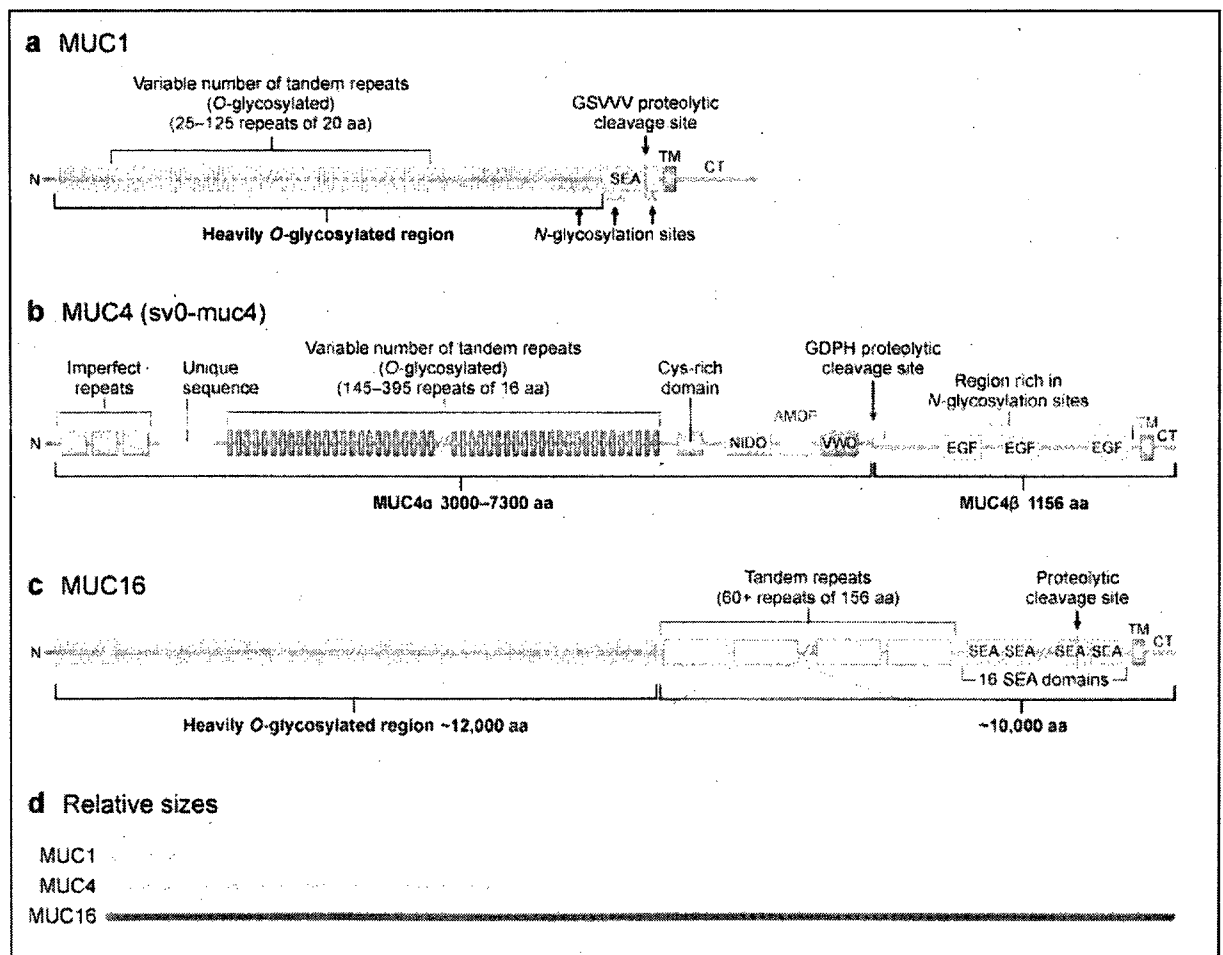
expression aberrante et coordonnée des mucines dans des cellules prémaligènes et cancéreuses mène à l'hypothèse que ces molécules contribueraient au phénotype malin des cellules tumorales (LONGMAN et al, 2000 et WRIGHT et al, 1997).

Les mucines liées à la membrane sont encodées par 10 gènes : *MUC1*, *MUC3A*, *MUC3B*, *MUC4*, *MUC11/12*, *MUC13*, *MUC15*, *MUC16 (CA125)*, *MUC17* et *MUC20*. Ces mucines ont des multiples fonctions biologiques. L'une des fonctions très importantes est leur rôle dans la transduction des signaux et la modulation du comportement des cellules cancéreuses menant à la potentialisation de la tumorigénicité et la métastase (SINGH et al, 2004 et HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). La structure d'oligosaccharides des mucines est impliquée dans des interactions ligands-récepteurs spécifiques (GENDLER et SPICER, 1995; HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Certaines mucines liées à la membrane possèdent dans leurs domaines juxta-membranaires deux ou trois motifs structuraux avec une séquence d'homologie pour EGF. Ces domaines semblent permettre aux mucines membranaires d'interagir avec les membres de la famille des EGFR et de réguler leur signalisation (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Leur grand domaine extracellulaire prévient l'interaction de molécules d'adhésion cellulaire avec leurs ligands respectifs et, par conséquent, une surexpression des mucines liées à la membrane peut affecter les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (SINGH et al, 2004 et HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004) (Figure 14).



## Figure 14 : Structure des principales mucines transmembranaires

La figure montre une représentation de (a) MUC1, (b) MUC4 et (c) MUC16. La plus grande sous-unité est extracellulaire. Elle est hautement glycosylée et elle contient : la séquence signal N-terminale (rouge), le domaine avec un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR= variable number of tandem repeats), des modules SEA (sperm protein, enterokinase, and agrin), la séquence d'homologie au nidogène (NIDO), le domaine associé à l'adhésion dans MUC4 et autres protéines (AMOP), la séquence pour le facteur von Willebrand D (VWD) et des régions ressemblants au EGFR (EGF). La sous-unité plus courte des mucines transmembranaires comprend une courte région extracellulaire, le domaine transmembranaire (TM) et la queue cytoplasmique (CT). La figure (d) donne une approximation de grandeurs relatives de MUC1, MUC4, et MUC16. (Modifié de HATTRUP et GENNDLER, 2008)



## 5.1 Les mucines dans le développement du cancer de l'ovaire et autres cancers

La surface épithéliale de l'ovaire possède un phénotype mixte épithélial-mésenchymateux et elle est la seule région des ovaires qui exprime des mucines (AUERSPERG et al, 1998 et 2001). Plusieurs cancers épithéliaux de l'ovaire expriment plus de mucines que la surface épithéliale normale de l'ovaire et que les tumeurs ovariennes bénignes. MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC et MUC16 sont surexprimés dans le cancer épithélial de l'ovaire (AUERSPERG et al, 2001; CHAUHAN et al, 2006; GIUNTOLI et al, 1998 et GUM et al, 2002) (Tableau 2)

**Tableau 2 : Profil d'expression des mucines dans l'ovaire normal et les sous-types du carcinome ovarien** (Tiré de SINGH et al, 2008)

	Normal ovary	Subtype				Detection methods
		Serous	Mucinous	Endometrioid	Clear cell	
MUC1 <sup>30-33*</sup>	+	+	+	+	+	Immunohistochemistry, northern blot
MUC2 <sup>30-32†</sup>	-	+	+	+	+	Immunohistochemistry, northern blot
MUC3 <sup>34,35‡</sup>	-	..	+	..	..	In situ hybridisation, oligonucleotide microarray
MUC4 <sup>33,34†</sup>	+	+	+	+	+	Immunohistochemistry, in situ hybridisation, northern blot
MUC5AC <sup>33,34‡</sup>	+	+	+	+	-	Northern blot, in situ hybridisation
MUC6 <sup>34†</sup>	..	+	+	-	+	In situ hybridisation
MUC16 <sup>33,34,37*</sup>	+	+	-	+	+	Immunohistochemistry, SAGE
MUC13 <sup>35‡</sup>	-	-	+	..	..	Oligonucleotide microarray, PCR
MUC17 <sup>33,34‡</sup>	-	..	+	..	..	Oligonucleotide microarray, in situ hybridisation

SAGE=serial analysis of gene expression. +=mostly detected; -=not detected; +=sometimes detected. \*Poor prognosis in ovarian cancer. †Not associated with prognosis.  
‡Role in prognosis of ovarian cancer not reported.

**Table 1: Expression profile of mucins in normal ovaries and subtypes of ovarian cancer**

Pendant les premiers événements de la transformation tumorale et dans les stades ultérieurs de la progression du carcinome ovarien, il se produit des changements dans le profil d'expression des mucines. Leurs modifications post-traductionnelles semblent avoir un rôle dans la croissance anormale et l'invasion (re-programmation de la signalisation) des cellules du cancer de l'ovaire. L'expression aberrante des mucines peut changer les propriétés adhésives et anti-adhésives des cellules tumorales, donc promouvoir la dissémination des cellules pendant la métastase (SINGH et al, 2008). Parmi les mucines liées à la membrane et exprimées à la surface épithéliale ovarienne, MUC1 est la plus étudiée (AUERSPERG et al, 2001 et 2002).

Une étude récente suggère un rôle possible de MUC1 dans la promotion de la survie des cellules propagées du cancer ovarien. MUC1 pourrait inhiber la mort cellulaire programmée en absence d'ancrage ou anoïkose de ces cellules (TAMADA et al, 2007). L'expression de MUC1 semble augmenter en relation avec la progression tumorale. Dans le cancer du sein, par exemple, l'expression de MUC1 corrèle avec une faible survie et un mauvais pronostic (BALDUS et al, 2004). Dans le pancréas, les niveaux de MUC1 sont minimes dans les lésions précoces mais dans le cancer invasif, ces niveaux augmentent énormément (MONIAUX, et al, 2004). Les propriétés normales d'adhésion et de protection de MUC1 sont récupérées pour les cellules tumorales pour prévenir l'accès de cellules immunitaires dans la tumeur (GENDLER 2001; CARRAWAY et al, 2005). L'expression de MUC1 dans les cellules tumorales est associée à une augmentation de métastases (NAKAMORI et al, 1994 et KOHLGRAF et al, 2003). L'interaction de MUC1 avec certaines molécules d'adhésion comme la protéine endothéliale ICAM-1 favorise le processus d'invasion dans

l'endothélium et l'attachement des cellules métastatiques aux sites distants (RAHN et al, 2005). Finalement, MUC1 peut induire plusieurs cascades de signalisation et promouvoir la croissance cellulaire de différents cancers (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). La signalisation de MUC1 débute par la phosphorylation de sa queue cytoplasmique de MUC1 (MUC1-CT) par des récepteurs de facteur de croissance comme ErbB1. MUC1-CT phosphorylée contribue à l'activation de Grb2-Sos et de la voie Ras-Erk ou à l'activation des événements de signalisation dépendants de la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). La queue cytoplasmique de MUC1 peut aussi être clivée et relocalisée au noyau en formant un complexe avec  $\beta$ -caténine ou  $\gamma$ -caténine. Dans le noyau, MUC1 semble avoir un rôle dans l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire comme la cycline D1 (PANKAJ et HOLLINGSWORTH, 2006).

MUC4 est hautement exprimé chez les cellules du cancer de l'ovaire provenant des effusions péritonéales dans presque 99% des patientes (SINGH et al, 2008). Dans la plupart des tumeurs, de hauts niveaux de MUC4 sont associés à un mauvais pronostic et un phénotype métastatique (SINGH et al, 2004). Le rôle de MUC4 dans le cancer est lié, en partie, à son association avec le récepteur ErbB2. Dans les cellules métastatiques du cancer du pancréas, MUC4 module l'activité d'ErbB2 et modifie la signalisation en aval de celui-ci (CHATURVEDI, et al, 2008). En plus de son influence sur ErbB2, MUC4 supprime l'inhibition de contact des cellules de cancer du sein à travers la destruction des adhésions cellule-cellule dépendantes des cadhérines. Ceci mène par conséquent à l'activation de ERK1/2 et de cycline D1 et favorise la croissance et la progression tumorale (PINO et al,

2006). Au-delà de la stimulation des voies de prolifération, la surexpression de MUC4 peut aussi conférer une résistance aux agents cytotoxiques (HU et al, 2003).

## **5.2 MUC16 (CA125)**

La surexpression de MUC1 et MUC4 par plusieurs carcinomes humains et les études faites pour déterminer ses fonctions dans la transformation maligne et la progression tumorale, ont supporté l'importance de l'étude des autres mucines comme MUC16 dans le développement du cancer. MUC16, antérieurement connue sous le nom de CA125, est la mucine associée à la membrane la plus longue ayant été clonée à ce jour et elle est reconnue comme étant le marqueur sérique du cancer ovarien (YIN et LLOYD, 2001). Même si CA125 a été étudiée pendant plusieurs années, sa grande taille (22 000 acides aminés) et sa vaste glycosylation ont fait que le gène n'a été cloné que récemment et seulement partiellement (YIN et LLOYD, 2001 et LLOYD et al, 1997). L'antigène tumoral CA125 a été découvert il y a plus de 25 ans, mais on possède très peu d'information sur son implication dans le comportement des cellules cancéreuses.

### 5.2.1 Découverte de MUC16

CA125 a été découvert en utilisant un anticorps monoclonal appelé OC125. En 1981, les Drs Bast, Knapp et leur équipe de recherche ont isolé cet anticorps monoclonal dirigé contre la lignée cellulaire OVCA433 (obtenue d'une patiente atteinte d'un cystadénocarcinome papillaire ovarien) (BAST et al, 1981). Cet anticorps réagissait avec un antigène de surface des cellules cancéreuses de l'ovaire (BAST et al, 1981), plus particulièrement les tumeurs ovariennes de type séreux (KABAWAT et al, 1983). Il est maintenant très bien établi que CA125 n'est pas seulement détecté dans le cancer ovarien mais aussi dans plusieurs autres tissus sécrétoires normaux et d'autres carcinomes. CA125 est le marqueur du cancer de l'ovaire par excellence et il est couramment utilisé comme outil de détection et de suivi des patientes (HARDARDOTTIR et al, 1990; ZURAWSKI et al, 1988; O'BRIEN et al, 1986; BAST et al, 1983).

### 5.2.2 La structure et les domaines de CA125

Le gène *MUC16* encode la protéine CA125. Il est situé aux loci p13.2-13.3 du chromosome 19 (KANEKO et al, 2003). Le gène *MUC16* comprend le plus long exon (21693 pb) de ce chromosome (GRIMWOOD et al, 2004).

Deux groupes de chercheurs ont réussi à cloner partiellement le ADNc de CA125 (YIN et LLOYD, 2001 et O'BRIEN et al, 2001). CA125 est une glycoprotéine transmembranaire de

type mucine dont le poids moléculaire excède 200 kDa et pourrait même aller jusqu'à 3,5 MDa (O'BRIEN et al, 2002).

La structure générale de la séquence de CA125 déterminée par ces deux groupes est la même: un domaine extracellulaire dominé par un domaine de répétitions en tandem, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (O'BRIEN et al, 2001). La différence entre les séquences des deux groupes consiste en un nombre différent de répétitions et la longueur du domaine N-terminal. O'Brien a évalué le nombre de répétitions à plus de 45 et pouvant même atteindre 60. La longueur totale de la protéine selon O'Brien serait évaluée à 22 152 acides aminés (O'BRIEN et al, 2001; O'BRIEN et al, 2002). La séquence de l'ADNc déterminée par Lloyd serait de 43kb et elle est presque entièrement homologue à la portion 3' de l'ADNc déterminée par O'Brien. Des sites potentiels d'épissage d'alternatif et la possibilité de polymorphismes donnant lieu à différents variants peuvent être responsables de l'incertitude face à la longueur de la protéine (O'BRIEN et al, 2001). Encore à ce jour, la séquence exacte et complète de CA125 n'est pas confirmée.

La protéine CA125 est composée de trois domaines principaux : un domaine N-terminal extracellulaire (domaine1), un long domaine de multiples répétitions (domaine 2) et un domaine C-terminal (domaine 3) qui inclut une portion transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (O'BRIEN et al, 2001) (Figure 15).

Le *domaine N-terminal* est formé de plus de 12 000 acides aminés (O'BRIEN et al, 2002) et il possède un grand potentiel pour des O-glycosylations dû à sa richesse en résidus sérine et thréonine. Ces glycosylations pourraient être responsables des interactions avec la matrice extracellulaire. Une autre partie moins glycosylée de ce domaine pourrait être responsable des interactions protéine-protéine dans la matrice extracellulaire (O'BRIEN et al, 2001). La présence de ce domaine rend difficile la purification de CA125 car il ne possède pas d'épitopes reconnus par les anticorps OC125 ou M11. La protéine CA125 est clivée *in vivo* par un mécanisme inconnu et ce domaine N-terminal fortement glycosylé est souvent retrouvé associé avec un nombre variable de répétitions, ce qui pourrait expliquer l'hétérogénéité de charge et de grandeur de la molécule de CA125 identifiée dans le sérum et le liquide d'ascites (O'BRIEN et al, 2001).

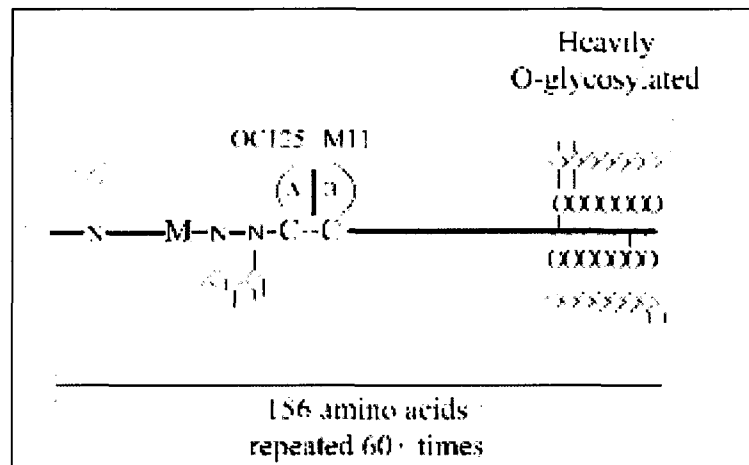
Le *domaine de répétitions en tandem* est caractéristique de la molécule de CA125 et représente une partie importante de la portion extracellulaire de la molécule. Les répétitions en tandem sont répétées 7, 20 ou même plus de 60 fois selon l'isoforme de la protéine (O'BRIEN et al, 2001; DORIGO et BEREK, 2007). Chaque répétition est formée de 156 acides aminés et est caractérisée par une nature hautement conservée, une uniformité dans la structure de l'exon, et une méthionine et deux cystéines complètement conservées (O'BRIEN et al, 2001) (Figure 16). Les cystéines permettraient la formation d'un pont disulfure au niveau de chaque répétition. Les épitopes OC125 et M11 seraient situées dans cette boucle (O'BRIEN et al, 1991 et BAST et al, 1983). Cette structure serait possiblement responsable des interactions avec les molécules avoisinantes de la matrice extracellulaire. Comme le



domaine N-terminal de la protéine, les répétitions en tandem sont fortement O-glycosylées et contiennent également quelques glycosylations en N.

**Figure 16 : Représentation schématique d'une unité répétitive de CA125**

Une répétition de CA125 de 156 acides aminés contient quelques glycosylations en N-terminal et un domaine fortement O-glycosylé dans sa partie C-terminale. Elle contient également une méthionine (M) et deux cystéines (C) complètement conservées. Les deux cystéines formeraient une boucle par un pont disulfure et cette boucle serait le site des épitopes OC125 (groupe A) et M11 (groupe B). (Tiré de O'BRIEN et al, 2001)



Le domaine C-terminal comprend une petite portion extracellulaire, une portion transmembranaire typique et une courte queue cytoplasmique. La portion extracellulaire de ce domaine ne comprend aucune homologie avec les autres domaines de la protéine (appelé domaine unique). Celui-ci comprend un site potentiel de clivage protéolytique situé à 50 acides aminés juxtamembranaires qui pourrait être responsable du relâchement de la portion extracellulaire de CA125 dans le milieu extracellulaire. (O'BRIEN et al, 2001). Le domaine C-terminal de la protéine comporte également une série de 25 acides aminés hydrophobes qui

représenteraient la portion transmembranaire de CA125. La queue cytoplasmique de la protéine comprend 31 acides aminés (YIN et LLOYD, 2001). On y retrouve 6 sites potentiels de phosphorylation: trois tyrosines, deux thréonines et une sérine près du domaine transmembranaire dont la phosphorylation coïnciderait avec le clivage de CA125 (O'BRIEN et al, 2001; YIN et LLOYD, 2001; KONISHI et al, 1994 et FENDRICK et al, 1997). De plus, le domaine cytoplasmique de CA125 contient un motif d'acide aminé chargé positivement (RRRKK). Ce motif pourrait aider au bon ancrage de la protéine à la membrane plasmique, donner un site potentiel de clivage enzymatique ou un signal imparfait de localisation nucléaire (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Le motif retrouvé chez CA125 est semblable à celui retrouvé chez la mucine MUC1 (RRK), une mucine dont la translocation nucléaire a déjà été observée (WEN et al, 2003).

La recherche de domaines conservés a révélé la présence de six domaines SEA dans la séquence en acides aminés connue de CA125 (YIN et LLOYD, 2001). Les domaines SEA sont des modules identifiés pour la première fois chez les protéines *sea* urchin sperm protein, entorokine et agrin. Cinq de ces domaines se trouveraient dans la région des répétitions et le dernier se retrouve dans le domaine unique. Les domaines SEA existent toujours dans la partie extracellulaire des protéines et sont souvent accompagnés de O-glycosylations vers la portion N-terminale, comme les répétitions de CA125 (MAEDA et al, 2004). Le domaine SEA servirait pour l'autoprotéolyse de la protéine et possiblement à l'association non-covalente des fragments générés par la protéolyse, comme démontré dans le cas de la mucine MUC1 et MUC3 (PALMAI-PALLAG et al, 2005; LEVITIN et al, 2005; KHATRI et al, 2003).

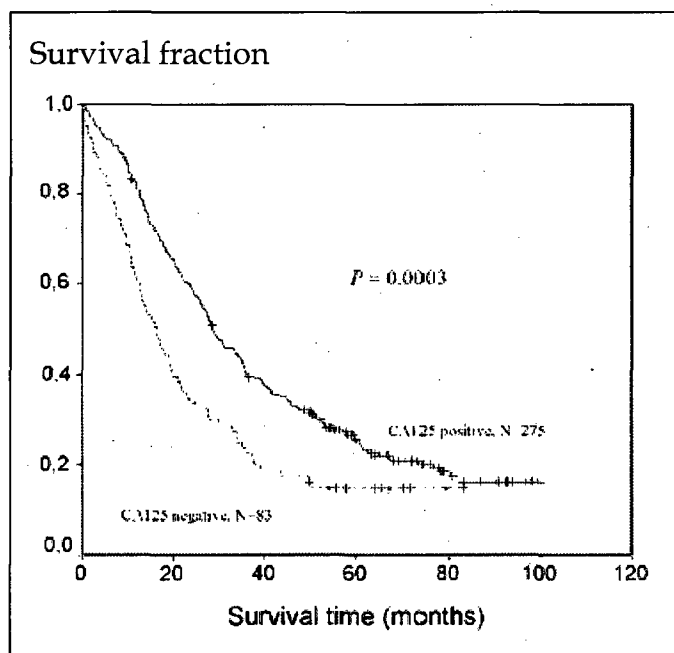
### 5.2.3 CA125: marqueur antigénique du cancer de l'ovaire

En plus d'être détecté dans plusieurs tissus, cancers et liquides biologiques normaux (BAST et al, 1983; BERCHUCK et al, 1989 BARBATI et al, 1991), l'antigène CA125 est le marqueur sérique utilisé régulièrement dans la pratique gynécologique pour surveiller des patientes avec cancer de l'ovaire. Il s'agit d'un antigène de différenciation müllérienne sécrété dans le flot sanguin et surexprimé dans 80% des cellules de cancers séreux de l'ovaire, moins souvent dans les cancers de type endométrioïde et à cellules claires, tandis que les tumeurs mucineuses sont quasi négatives pour CA125 (BAST et al, 1998). Après sa découverte, de nombreuses études ont confirmé l'utilisation des niveaux sériques de CA125 pour déterminer la progression du cancer épithélial ovarien (BAST et al, 1998 et MEYER et RUSTIN, 2000). La plupart de ces études montrent qu'une augmentation des niveaux de CA125 précède environ de 3 mois la détection clinique de la maladie (YIN et LLOYD, 2001). Cependant, CA125 ne peut pas être utilisé dans le diagnostic initial du cancer épithélial de l'ovaire à cause de son élévation aussi importante dans d'autres conditions bénignes (BAST et al, 1998 et MEDEN et FATTAHI-MEIBODI, 1998). Chez 90% des patientes avec un cancer ovarien, une montée des niveaux sériques de CA125 corrèle avec une progression de la maladie. Une réduction de CA125 peut indiquer une bonne réponse à des tests pharmaceutiques en phase II (RUSTING et al, 2004). CA125 peut aussi avoir un rôle dans la différenciation des masses pelviennes bénignes et malignes. Une élévation de CA125 (>50 U/mL) est associée avec une masse pelvienne maligne dans 94% des cas (JACOBS et al, 1990). Jacobs et ses collaborateurs ont développé un indice de risque de malignité d'une masse pelvienne en utilisant une combinaison des valeurs de CA125,

l'échographie par voie endovaginale et le statut ménopausal (JACOBS et al, 1990). Basé sur ces tests, les patientes peuvent être sélectionnées pour une chirurgie définitive. La demi-vie de CA125 corrèle avec la survie des patientes atteintes du cancer ovarien. Chez les patientes avec une complète rémission, la demi-vie de CA125 est de 2 semaines. Avec une maladie résiduelle persistante, la demi-vie est plus longue. Une réponse rapide et complète à la chimiothérapie raccourcira sa demi-vie (HUNTER et al, 1990). Le suivi de CA125 à travers le temps a permis d'établir que l'élévation des valeurs de CA125 est associée au cancer de l'ovaire, tandis que des valeurs stables de CA125, même si élevées, sont associées à des conditions bénignes (SKATES et al, 1995). Une étude d'Hogdall en 2007 décrit une corrélation entre l'expression de CA125 des tissus et les niveaux sériques de CA125. De façon intéressante, 50% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire en stade précoce démontrent une élévation de la concentration sérique de CA125 et dans 50% des tumeurs de stade I, CA125 est détectable à leur surface (HOGDALL et al, 2007). Chez les stades avancés, par contre, plus de 80-95 % des patientes montrent des concentrations sériques de CA125 élevées (> 35 U/mL) alors qu'on observe une perte de CA125 à la surface de la tumeur (HOGDALL et al., 2007; BERCHUCK et al., 1989). Les patientes en stades III et IV qui montrent des tumeurs CA125-négatives ont une survie significativement plus courte que les patientes aux tumeurs CA125-positives (HOGDALL et al, 2007) (Figure 17).

### Figure 17 : Courbes de survie de Kaplan-Meier spécifiques du cancer ovarien

Le graphique indique 358 patientes dans un stade III ou IV de carcinome ovarien avec des tissus CA125 positive (N=275) et patientes dans un stade III ou IV de carcinome ovarien sans expression de CA125 aux tissus (N=83) (Tiré de HOGDALL et al, 2007)



#### 5.2.4 Les fonctions proposées de CA125

Malgré plus de 25 ans de recherche clinique et fondamentale, les fonctions biologiques de CA125 ne sont pas très bien connues. Quelques fonctions de CA125 ont été suggérées selon la description de sa séquence peptidique, la structure proposée et les études in vitro effectuées. Par exemple, CA125 pourrait jouer un rôle important dans l'adhésion cellulaire, l'invasion et les métastases intrapéritonéales. Cette fonction est appuyée par l'observation que CA125 peut se lier à la mésothéline, une protéine hautement exprimée à la surface

péritonéale. En se liant à la mésothéline, CA125 peut augmenter le potentiel d'invasion des cellules du cancer ovarien. (GUBBELS et al, 2006). En plus, CA125 fonctionne comme une protéase dépendante du calcium avec l'habilité de cliver d'autres protéines, et possiblement faciliter encore plus l'invasion de cellules (DORIGO et BEREK, 2007). La présence de CA125 dans les membranes embryonnaires suggère un rôle comme lubrifiant, une caractéristique de protéines hautement glycosylées. Deux études ont démontré que CA125 peut aider aux cellules tumorales à s'échapper de la surveillance immunitaire (BELISLE et al, 2007 et PATANKAR et al, 2005). CA125 inhibe in vitro l'activité cytolytique des cellules "natural killer" en diminuant l'expression de récepteurs CD16. Les cellules du cancer ovarien sont protégées de l'attaque du complément grâce au fait que CA125 peut attraper et détruire certains de ses effecteurs (PATANKAR et al, 2005).

## **6. Modèles cellulaires établis au laboratoire permettant l'étude fonctionnelle de CA125**

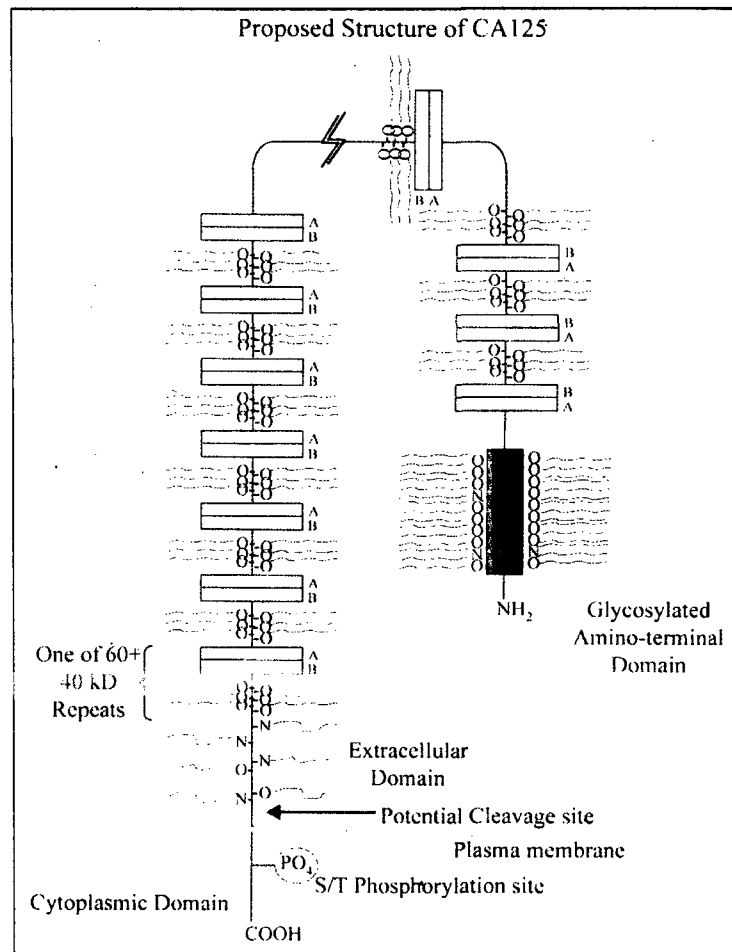
Un premier modèle cellulaire d'étude a été établi dans notre laboratoire en 2003. Dans ce modèle qu'on appelle "modèle perte de fonction" on a bloqué l'expression de surface de CA125 chez des cellules l'exprimant fortement en temps normal. Plus tard, d'autres "modèles gain de fonction" ont été dérivés dans des cellules CA125-négatives chez lesquelles l'expression de certains domaines (cytoplasmiques, transmembranaire et extracellulaires) de la protéine CA125 a été forcée.

## 6.1 Modèle de perte de fonction (knockdown)

À partir de la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire NIH:OVCAR-3, cellules qui expriment fortement CA125, des clones stables knockdown pour CA125 à la surface cellulaire ont été établis. Les cellules ont été transfectées de façon stable avec un "single-chain fragment variable" (scFv) ou mini anticorps et dirigé contre CA125. Ce scFv construit dans le laboratoire, est spécifique à la portion extracellulaire de CA125 (domaine des répétitions) et contient un signal de sécrétion et une séquence de localisation au réticulum endoplasmique KDEL. Pour que CA125 soit exprimé à la surface cellulaire, il doit emprunter la voie de sécrétion en passant par le réticulum endoplasmique où il est séquestré par le scFv localisé et retenu dans ce compartiment cellulaire. On dit donc que les clones stables générés imitent un knockdown de CA125. Ce modèle perte de fonction compte quatre populations et clones de cellules : la lignée parentale OVCAR-3 BMC, le clone stable KDEL 4:5 # 12 (un contrôle négatif qui exprime un scFv mais qui ne lie pas CA125), le clone stable KDEL 1:9 # 9 et le clone stable KDEL 1:9 # 7 (deux clones où CA 125 se retrouve séquestré au réticulum endoplasmique par un scFv). Ces clones ont été validés pour la diminution d'expression de CA125 à la surface cellulaire (BEAUDIN, 2003) (Figure 18).

**Figure 15 : Structure de CA125 proposée par le groupe O'Brien en 2001**

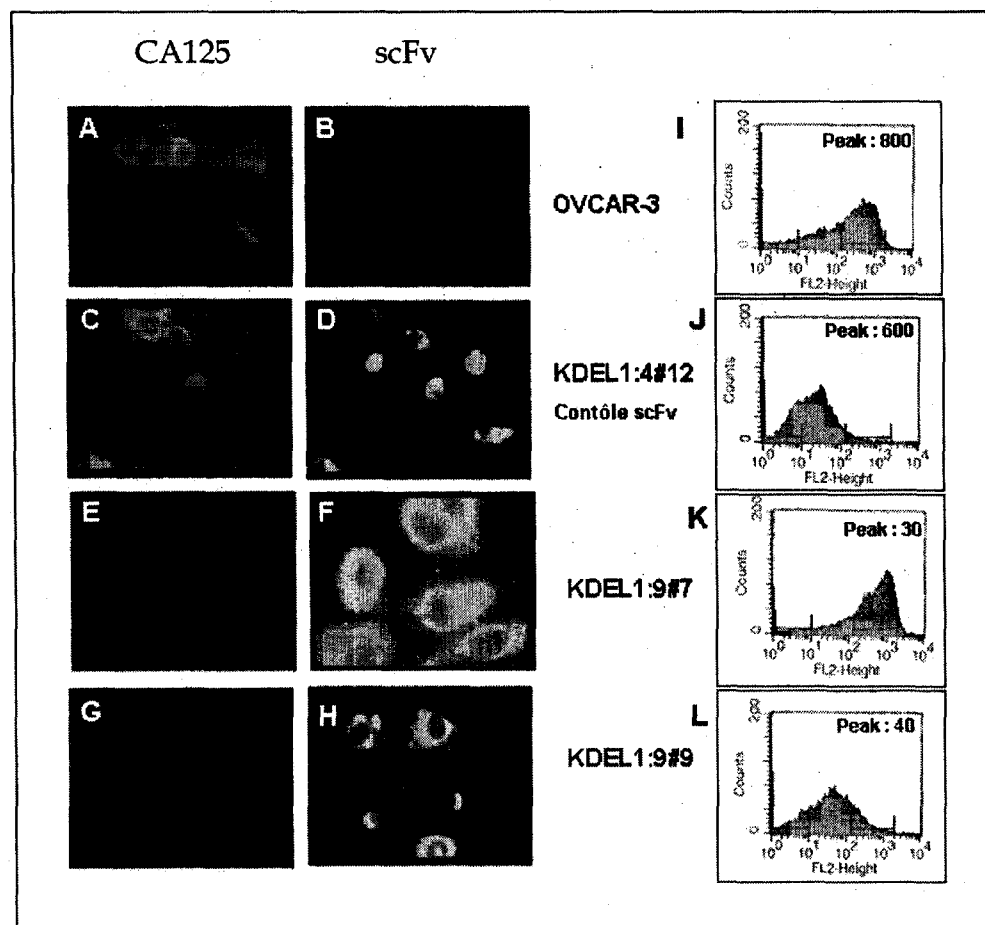
La molécule est dominée par un long domaine extracellulaire de répétitions qui contiennent les épitopes pour les anticorps M11 (A) et OC125 (B) et un domaine N-terminal fortement glycosylé. Elle est ancrée par un domaine transmembranaire et elle possède aussi une queue cytoplasmique avec des sites potentiels de phosphorylation (Tiré de O'BRIEN et al, 2001).





**Figure 18 : Validation des clones knockdown pour CA 125**

A-H : Immunofluorescence indirecte sur lame avec des cellules perméabilisées effectuée sur les différents clones OVCAR-3. A, C, E et G : expression de CA 125 (rouge) chez les cellules contrôles (A,C) et chez les cellules "knockdown" pour CA125 (E, G). B, D, F et H : expression des scFv (vert) chez les cellules "knockdown" (F; H), chez les cellules KDEL 4:5 #12 (scFv contrôles) (D) et absence d'expression de scFv chez la lignée parentale OVCAR-3 (B). I, J, K et L : niveau d'expression de CA125 évalué par cytométrie de flux chez les cellules contrôles et chez les clones "knockdown" avec des cellules non-perméabilisées. Chez les cellules contrôle (I, J) nous observons un signal optique entre 800 et 600 tandis que pour chez les clones "knockdown" (K, L), nous obtenons un signal inférieur à 40.



## **6.2 Modèle gain de fonction : expression des domaines cytoplasmiques de CA125**

Une population stable exprimant le domaine C-terminal (CTD) de CA125 (MUC16-CTD) a été générée à l'aide d'une lignée cellulaire de cancer ovarien SKOV3, des cellules CA125-négatives. La séquence des domaines cytoplasmique, transmembranaire et unique a été clonée dans un plasmide permettant de former une protéine de fusion avec deux étiquettes, polyhistidine et c-myc, toutes deux situées en C-terminal de la protéine. Cette population stable, la population stable contrôle (exprimant le plasmide seul, EV) et la lignée parentale ont été validées pour l'expression de la protéine MUC16-CTD ainsi que sa bonne localisation cellulaire, c'est-à-dire membranaire. Ces constructions ont été fabriquées et validées par Marianne Boivin (BOIVIN, 2005). Les validations ont été faites par immunofluorescence indirecte sur lame et par immunoprécipitation suivie d'un gel SDS-PAGE (Figure 19)

Les populations stables sont dérivées de la lignée cellulaire SKOV3. La population stable nommée SKOV3-MUC16-CTD exprime le domaine C-terminal de CA125 tandis que la population SKOV3-EV contient seulement le vecteur vide. Les trois lignées cellulaires (la lignée parentale et les 2 populations stables) ont été validées pour leur expression de la construction MUC16-CTD (en vert) par immunofluorescence indirecte sur lame avec des cellules perméabilisées (en bleu, l'ADN des noyaux des cellules coloré au DAPI). L'expression de la construction MUC16-CTD n'est pas pareille parmi toutes les cellules SKOV3, ce qui explique que une seule cellule montre la fluorescence de telle construction. L'expression de la protéine MUC16-CTD a également été prouvée par immunoprécipitation avec les étiquettes polyhistidine et c-myc de la protéine de fusion suivie d'un gel SDS-PAGE.

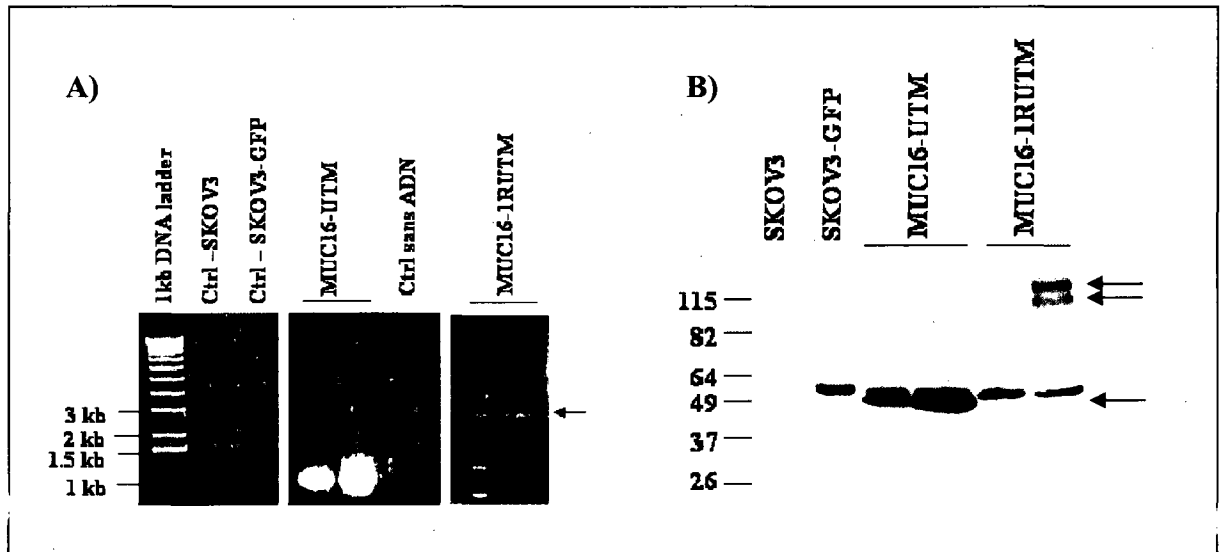


### **6.3 Modèle gain de fonction : expression des domaines extracellulaires de CA125**

La construction des plasmides pour l'expression membranaire des domaines extracellulaires de CA125 a été effectuée par un système d'expression lentiviral. La lignée cellulaire de cancer ovarien SKOV3 (cellules qui n'expriment pas CA125) a été utilisée. MUC16-UTM et MUC16-1R-UTM sont les populations créées. Les constructions sont ancrées à la membrane plasmique des cellules qui les expriment. Elles possèdent donc le domaine unique, le domaine transmembranaire et 3 acides aminés chargés positivement du domaine cytoplasmique (MUC16-UTM) afin de permettre un bon ancrage à la membrane. MUC16-1R-UTM possède, en plus, une répétition. Ces protéines recombinantes possèdent deux étiquettes, polyhistidine (His<sub>(6)</sub>) et c-myc, respectivement en N- et en C-terminal de la protéine. La validation de ces populations stables exprimant les domaines de CA125 à la membrane a été faite par RT-PCR pour valider l'expression des transcrits codant pour les différentes protéines recombinantes puis par une analyse des lysats cellulaires pour l'expression protéique (Figure 20). La localisation des protéines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM chez les populations stables a été vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lame (Figure 21) (MIGNEAULT, 2007)

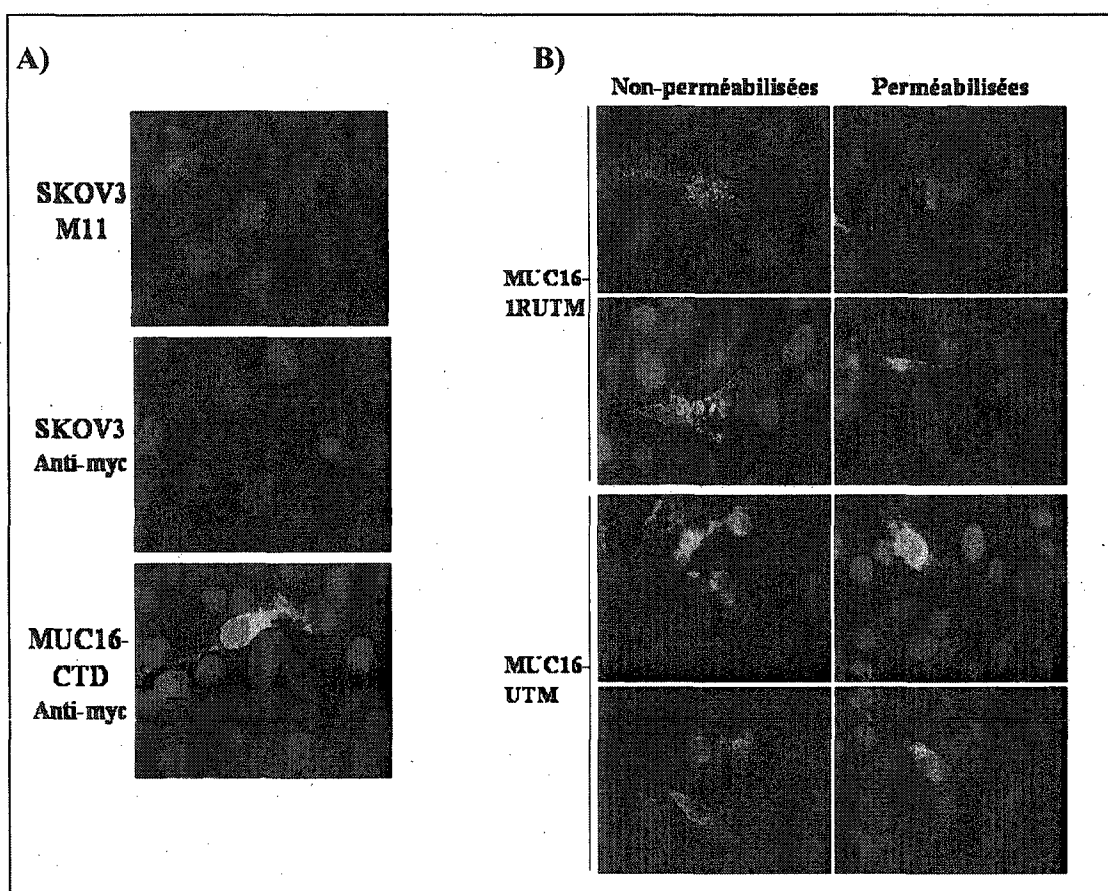
**Figure 20 : Validation de l'expression des protéines recombinantes membranaires (domaines extracellulaires de CA125)**

En (A), gel d'agarose où on observe les produits de PCR : les contrôles négatifs, les bandes correspondantes aux poids moléculaires pour les constructions UTM (1028 pb) et 1RUTM (2801 pb). En (B), immunobuvardage de type western analysé avec l'anticorps anti-c-myc. Les poids moléculaires de MUC16-UTM et MUC16-1RUTM sont d'environ 49 kDa et 115 kDa comparés aux poids moléculaires attendus de 34,1 et 100,4 kDa, respectivement. Ces différences dans les poids moléculaires s'expliqueraient par l'acquisition de glycosylations par les domaines unique et des répétitions.



# **Figure 21 : Localisation cellulaire des protéines de fusion MUC16-UTM et -1RUTM**

La localisation des protéines MUC16-UTM et MUC16-1RUTM chez les populations stables a été vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lame. En (A), les cellules contrôles négatifs (SKOV3) et les cellules positives (MUC16-CTD) perméabilisés et incubés avec les anticorps M11 et anti-c-myc. En (B), détection de MUC16-UTM et MUC16-1RUTM (vert) avec l'anticorps anti-c-myc. ADN du noyau coloré au DAPI (bleu).



#### **6.4 Résultats obtenus dans le laboratoire permettant d'établir une relation entre CA125 et le potentiel métastatique des cellules de cancer de l'ovaire**

Les différents modèles d'études décrits précédemment ont été utilisés par différents étudiants du laboratoire. Ils ont permis de montrer les caractéristiques phénotypiques de chaque modèle. La perte de CA125 à la membrane cellulaire produit un changement de la morphologie cellulaire (les cellules CA125 knockdown sont plus grosses, adoptent une forme plus allongée avec des extensions cellulaires, poussent de façon plus étalées et ne sont pas entassées). En plus, la perte de CA125 augmente la sensibilité à l'inhibition de contact, diminue l'adhésion cellule-cellule (peu de croissance en absence d'ancrage et de formation de sphéroïdes) et diminue la tumorigénicité chez les souris. De façon remarquable, il a été observé que les cellules CA125 knockdown présentent une augmentation de l'expression du gène et niveaux de la protéine CD44 et une augmentation de la sécrétion, de l'activation et de l'expression de la proMMP2. (PINARD, 2005). Les protéines CD44 et MMP2 ont un rôle très important dans la métastase tumorale.

Dans le cas du modèle de gain de fonction par le domaine C-terminal de CA125, la morphologie de la lignée cellulaire utilisée n'a pas été altérée avec le gain de fonction. On a observé une diminution de l'inhibition de contact et une augmentation de la tumorigénicité chez les souris.

Globalement, les résultats obtenus par notre laboratoire indiquent que CA 125 pourrait encourager le développement et la progression du cancer de l'ovaire. De plus, la queue

cytoplasmique de la protéine semble très importante pour donner la majorité des fonctions observées à la protéine. Les modifications de la morphologie cellulaire et les caractéristiques variables de croissance des cellules CA125 knockdown font réfléchir sur l'implication de cette mucine dans le processus métastatique.

## **7. Hypothèse et objectifs du projet**

Les mucines, en général, sont connues comme étant des biomolécules impliquées dans la protection et la lubrification des surfaces épithéliales. Cependant, plusieurs réalisations ont démontré leurs fonctions comme modulateurs de la signalisation cellulaire ainsi que leur rôle affectant le phénotype des cellules tumorales. CA125 semble important pendant la tumorigenèse du cancer de l'ovaire, le maintien des interactions cellulaires, l'interaction avec certaines protéines et le processus de migration et d'invasion.

L'hypothèse de ce projet est que l'antigène tumoral CA125 influence le potentiel métastatique des cellules de cancer de l'ovaire. Notre objectif principal est donc d'observer l'influence de CA125 dans la fonctionnalité des complexes de jonctions intercellulaires des cellules de cancer ovarien. Selon les variations observées, on déterminera s'il existe une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans les cellules de cancer ovarien qui n'expriment pas CA125 à la surface cellulaire. Ensuite, on identifiera l'impact des différents domaines de CA125 sur les interactions cellule-cellule et le potentiel métastatique des cellules de cancer ovarien et finalement on investiguera l'importance de certains facteurs de croissance sur le phénotype EMT des cellules knockdown pour MUC16. Pour atteindre ces



objectifs, des essais avec les clones stables CA125 knockdown et des populations stables exprimant différents domaines de CA125 (domaines cytoplasmiques et extracellulaires) seront effectuées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 8. Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires utilisées sont cultivées dans des flacons T-75 à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>. La lignée cellulaire NIH : OVCAR-3 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire humaine dérivée de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu RPMI 1640 (Wisent, St-Bruno, Canada) supplémenté de 4mM de L-glutamine (Wisent, St-Bruno, Canada), 0.01 mg/ml d'insuline (Sigma, Saint-Louis, Missouri), 20% de FBS (Wisent, St-Bruno, Canada), 100 U/ml de pénicilline (Wisent, St-Bruno, Canada) et 2.5 µg/ml d'amphotéricine B (Wisent, St-Bruno, Canada). Les clones stables KDEL 4 :5 #12 (scFv contrôle), 1 :9 #9 et 1 :9 #7 dérivés de la lignée parentale NIH : OVCAR-3 sont maintenus en culture de la même manière que cette dernière, à l'exception qu'ils sont toujours mis en présence de 1 µg/ml de doxycycline (Sigma, Saint-Louis, Missouri) afin d'induire la production du scFv et 1 µg/ml de blasticidine (CN Biosciences, San Diego, CA) comme agent de sélection pour ne conserver que les clones stables ayant intégrés l'ADN contenant la séquence du scFv. Le passage cellulaire de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 : 3 à tous les 3-4 jours lorsque les cellules atteignent une confluence de 80% à 90%.

La lignée SKOV-3 (ATCC, Manassas, VA) est une lignée cellulaire humaine provenant aussi de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire. Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu DMEM/F12 (Wisent, St-Bruno, Canada) supplémenté

de 4mM de L-glutamine, 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 2.5 µg/ml d'amphotéricine B. Pour la culture des populations stables dérivant de cette lignée cellulaire, on ajoute à ce milieu de culture 2 µg/ml blasticidine. Le passage cellulaire de cette lignée s'effectue dans un ratio de 1 : 3 à tous les 3-4 jours lorsque les cellules atteignent une confluence de 80% à 90%.

Lors d'un passage cellulaire, le milieu de culture des cellules a été retiré du flacon T-75 et les cellules ont été lavées avec 5 mL de PBS (Wisent Inc, St-Bruno, Québec). Les cellules ont ensuite été décollées à l'aide d'une incubation de 1 à 5 minutes dans les incubateurs de culture avec 2 mL d'une solution 0,05% trypsine et 0,53 mM EDTA (Wisent, St-Bruno, Canada). Les cellules, alors en suspension, ont été récoltées des flacons avec 5 mL de milieu de culture et placées dans un tube conique de 15 mL pour être centrifugées à 1000 RPM durant 5 minutes dans une centrifugeuse Labofuge 400R (VWR, Montréal, Québec). Le surnageant a été aspiré et le culot de cellules resuspendu dans du milieu de culture. Le tiers des cellules a été réensemencé dans leur T-75 respectif. Du milieu de culture a été ajouté aux T-75 de façon à obtenir un volume total de 10 mL.

## **9. Essai de migration par blessure de la monocouche de cellules**

Les différentes cellules utilisées pour cet essai ont étéensemencées dans des plaques 6 puits de façon à obtenir 100% de confluence cellulaire le lendemain. Une fois la confluence atteinte, on a fait une blessure de la monocouche de cellules en traçant dans le fond du puits une croix à l'aide d'un embout de micropipette de 10 µL. Immédiatement, les cellules ont

été lavées 2 fois avec du PBS. Du milieu de culture complet contenant de 30 mM et 75 mM d'hydroxyurée (SIGMA, Steinheim, Allemagne) a été ajouté aux cellules OVCAR-3 et SKOV-3 respectivement. Cette concentration a préalablement été déterminée comme étant suffisante pour inhiber la prolifération des cellules utilisées sans induire leur mortalité. Les plaques ont été incubées à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Des photos des puits ont été prises immédiatement après le traçage de la croix (temps= 0h) et à 24 heures pour observer la migration des cellules dans l'espace créé par la blessure.

#### **10. Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden**

Les chambre de Boyden (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario) ont été déposées dans un plaque de 24 puits et leurs membranes ont été hydratées avec du milieu de culture sans sérum à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 1 heure. Les cellules en culture à 40-50% de confluence ont été décollées à l'aide de versène (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada), récoltées, lavées avec du milieu sans sérum et dénombrées manuellement avec un hématimètre. Une quantité de 5000 cellules de la lignée NIH : OVCAR-3 ou 3500 cellules de la lignée SKOV-3 ont été suspendues dans une solution totale de 300-350 µL de milieu sans sérum. Ensuite, du milieu complet a été ajouté en dessous de la membrane de la chambre (dans les puits de la plaque) et les cellules sur la membrane. Ce milieu complet servira de chimioattractant aux cellules capables de traverser la membrane. Suite une incubation à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 16-20 heures selon la lignée cellulaire, les cellules à l'intérieur des chambres ont été enlevées à l'aide de tiges à bout de coton. Les cellules qui étaient au dessous de la membrane ont été fixées avec du méthanol froid pendant 5 minutes. Les cellules ont été ensuite lavées 2 fois

dans du PBS et colorées avec du cristal violet 1% pendant 10 minutes. Plusieurs lavages dans du PBS ont été effectués pour enlever le maximum de colorant. Les membranes ont été découpées avec une lame de rasoir et conservées entre une lame et une lamelle. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500. Le nombre de cellules par champs été dénombré à l'aide d'un microscope à contraste de phase à un grossissement de 10X.

## **11. Immunofluorescence indirecte sur lame**

Les cellules cultivées en flacons T-75 et à une confluence d'environ 80% ont été trypsinisées, centrifugées, resuspendues dans du milieu complet et environ 10% d'elles ont été déposées sur des lames de verre stériles labteck (BD Falcon, Bedford, MA) dans des pétris de culture cellulaire. Les cellules ont été incubées de 3 à 5 heures à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> afin de permettre leur adhérence à la surface des lames. Après cette période d'incubation, 10 mL de milieu complet ont été ajouté à chaque pétri et le tout a été incubé à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 80%, les lames ont été rincées à deux reprises avec du PBS pour Immunofluorescence (0,17 M chlorure de sodium, 3,3 mM chlorure de potassium (Fisher Scientific), 10 mM phosphate de sodium dibasique, 1,8 mM phosphate de potassium monobasique; pH 7,4). Les lames ont ensuite été fixées avec une solution de 3,7% de formaldéhyde (Fisher Scientific, New Jersey, USA) / PBS à 4°C pour 15 minutes. Les cellules ont été lavées 1 fois dans du PBS durant 10 minutes à température de la pièce sur une plaque agitatrice. Les lames ont été incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de quenching (glycine 0.1M / PBS). Les cellules ont été perméabilisées ou non,

dépendant de l'expérience, dans une solution PBS / 0,2% TritonX-100 (ICN Biomedicals, Solon, OH) durant 20 minutes à la température de la pièce. Deux lavages de 10 minutes ont été faits sur la plaque agitatrice à la température de la pièce avec du PBS. Ensuite, les cellules ont été incubées 1 heure dans une solution de blocage (2% Bovine Serum Albumin Fraction V, heat shock (BSA) (Roche)) / PBS à température ambiante. Une dilution adéquate de l'anticorps primaire (voir tableau 3) dans la solution de blocage a ensuite été appliquée sur chacune des lames et incubées 1 heure à température ambiante dans une boîte humidifiée. Les lames ont ensuite été lavées 2 fois 10 minutes dans du PBS sur une plaque agitatrice à la température de la pièce. Les étapes subséquentes ont été effectuées à la noirceur parce que les anticorps secondaires utilisés sont couplés à une molécule fluorescente. Après la dilution adéquate de l'anticorps secondaire (voir tableau 3) dans la solution de blocage, celui-ci a été placé sur les lames ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante dans une boîte humidifiée. Après deux autres lavages de 10 minutes avec du PBS, la coloration de l'ADN des noyaux a été effectuée par le 4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole (DAPI). Le DAPI (Roche, Mississauga, Ontario) a préalablement été dilué 1 : 100 000 dans la solution de blocage puis les lames ont été incubées dans cette solution pendant 2 minutes. Un dernier lavage des cellules a été fait dans du PBS pour 10 minutes sur plaque agitatrice. Une goutte de solution de montage (9,25 mM p-phénylènediamine, 10% PBS / 90 mL glycérol, pH 9) a été ajouté sur les lames et une lamelle micro cover glass (VWR, Montréal, Canada) a ensuite été déposée sur chaque lame. L'excédant de milieu de montage a été récupéré en pressant doucement les lames dans du papier absorbant. Les lames ont ensuite été analysées à l'aide de l'objectif 100X d'un microscope à fluorescence Olympus1X70 (Olympus, Hamburg, Allemagne) et des photos ont été prises.

## **12. Microscopie électronique**

Les cellules des différentes populations ont étéensemencées dans des pétris de culture de 35 mm x 10 mm. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à l'atteinte de la confluence. Les cellules ont ensuite été remises au Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire de la Université de Sherbrooke pour leur préparation à la microscopie électronique. Une fois les coupes de cellules terminées, celles-ci ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission H-7500 (HITACHI). Des photos ont été prises à des grossissements de 60 000X, 70 000X, 80 000X et 100 000X.

## **13. Lyse cellulaire**

Les cellules cultivées dans des plaque 6 puits (BD Falcon, Bedford, MA) ou dans des flacons T-75 ont été lavées avec 2 ml ou 5 ml de PBS respectivement. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 150 µL (plaque 6 puits) ou 700 µL (T-75) de tampon de lyse (20 mM Tris pH 7.5 (Roche diagnostics, Indianapolis, IN), 150 mM NaCl (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 1mM EDTA (Sigma, St-Louis, Missouri), 1 mM EGTA (Sigma, St-Louis, Missouri), 1% Triton X-100 (ICN Biomedicals, Solon, OH). Dans les expériences d'immunobuvardage de type western pour l'analyse des protéines phosphorylées, un autre tampon de lyse a été utilisé : (0.01M Tris HCl pH 7.3), 150 mM NaCl, 0.01M MgCl<sub>2</sub> (Fisher scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5% NP-40 (EM Science, Darmstadt, Allemagne). Le tampon de lyse NP40 est moins dénaturisant, inhibe moins l'activité kinase des protéines et il n'interrompt pas les

complexes protéiniques. Aux deux tampon de lyse ont été préalablement ajoutés les inhibiteurs de protéases AEBSF 1  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma, St-Louis, Missouri), 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptine (Sigma, St-Louis, Missouri), 20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinine (Sigma, St-Louis, Missouri), 0,7  $\mu\text{g/ml}$  pepstatine A (Sigma, St-Louis, Missouri) et les inhibiteurs de phosphatases NaF 10mM (Sigma, St-Louis, Missouri), orthovanadate 400  $\mu\text{M}$  (Sigma, St-Louis, Missouri),  $\text{Na}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$  100  $\mu\text{M}$  (Sigma, St-Louis, Missouri). L'incubation dans le tampon de lyse s'est effectuée durant 20 minutes à 4°C avec agitation. Les cellules ont ensuite été récoltées à l'aide d'un grattoir (Starstedt, Newton, NC) et centrifugées à 13000 RPM durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (lysat cellulaire) a été utilisé immédiatement ou conservé à -20°C pour usage ultérieur.

#### **14. Dosage de protéines**

Afin de faire une courbe standard, des solutions de BSA de concentrations de 0 mg/ml, 0.088 mg/ml, 0.176 mg/ml, 0.353 mg/ml, 0.705 mg/ml et 1.41 mg/ml ont été préparées et les lysats ont été dilués 1 : 5 ou 1 : 10 avec de l'eau distillée. Le réactif de Bradford (Biorad, Hercules, CA) a ensuite été dilué 1 :5 avec de l'eau distillée et un volume de 1 ml de cette solution a été déposé dans chaque cuvette de plastique (Starstedt, Newton, CA) pour spectrophotomètre. Par la suite, 20  $\mu\text{l}$  de solution de courbe standard ou de l'échantillon dilué ont été déposés dans les cuvettes. Après avoir laissé la réaction de coloration s'effectuer à température pièce pour une durée allant de 5 à 60 minutes, la densité optique de chaque cuvette a été prise à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman Coulter, Fullerton,



CA). Une courbe standard a été réalisée en portant la concentration protéique en fonction de la densité optique et la concentration protéique des échantillons a été déterminée à partir de cette courbe.

## **15. Gel SDS-PAGE et immunobuvardage de type western**

Premièrement, un gel d'acrylamide (SDS-PAGE) (EMD, Darmstadt, Allemagne) a été fabriqué, selon l'expérience, à une concentration de 7.5%, 10%, 12% ou 15% dans le cas du gel séparateur et de 4% pour le gel concentrateur. De 7 à 15 µg de protéines ont été incubés à 95°C pendant 5 minutes avec du tampon de chargement (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% (m/v) SDS (Invitrogen), 50% (v/v) glycérol, 681 mM β-mercaptoéthanol (Sigma) et rouge de phénol (Fisher Scientific)). Les échantillons de protéines ont ensuite été placés sur les gels SDS-PAGE. La migration des échantillons dans le gel a été faite à 150V durant 1 heure dans un tampon de migration pH 8.3 (25 mM Tris, 0,2 M glycine (WISSENT Inc.), 1% (p/v) SDS). Pour l'immunobuvardage, le transfert des protéines sur une membrane de PVDF (Roche diagnostics, Indianapolis, IN) a été effectué à 4°C pendant 90 minutes sous un courant de 300 mA dans un tampon de transfert froid (20% méthanol (EMD, Darmstadt, Allemagne), 25 mM Tris et 192 mM glycine). Suite au transfert des protéines sur la membrane PVDF, celles-ci ont été bloquées dans un tampon de blocage (5% lait (Biorad, Hercules, CA), 0,01% (v/v) Tween<sup>®</sup> 20 (EMD, Darmstadt, Allemagne) / PBS) pendant 1 heure avec agitation à température ambiante. L'anticorps primaire a ensuite été dilué de façon appropriée (voir tableau 3) dans le tampon de blocage et la membrane a été incubée à 4 °C avec agitation

durant toute la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée à température ambiante à 3 reprises avec agitation pendant 15 minutes avec du tampon de lavage (0,01% Tween<sup>®</sup> 20 / PBS). La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (voir tableau 3) dilué dans la solution de blocage durant 45 minutes à température ambiante avec agitation. Encore une fois, la membrane a été lavée à température ambiante avec agitation à trois reprises pendant 15 minutes avec du tampon de lavage. La révélation de la membrane a finalement été faite à l'aide du kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Angleterre) en suivant les instructions fournies par le fabricant. Des films Kodak Scientific Imaging (PerkinElmer Life Sciences) ont été utilisés lors de l'exposition des membranes.

**Tableau 3 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés et conditions d'utilisation.**

ANTICORPS	COMPAGNIE	DILUTION pour immuno- buvardage de type western	DILUTION pour immuno- fluorescence
Anti-E-cadhérine Clone 67A4 (souris)	Chemicon International, Inc. Massachusetts USA	---	1 : 750
Anti-E-cadhérine Clone 36/E-cadherin (souris)	BD Biosciences Ontario, Canada	1 : 2500	1 : 600
Anti-claudine-7 Clone 5D10F3 (lapin)	Zymed Laboratoires, Inc. California, USA	1 : 750	1 : 250
Anti-cytokeratine 8-18 Clone Zym5.2 (souris)	Zymed Laboratoires, Inc. California, USA	---	1 : 200

Anti-calreticuline (lapin)	Cedarlane Laboratories Ontario, Canada	---	1 : 200
Anti-F actine (souris) Phalloidin-TRITC P1951	Sigma Missouri, USA	---	1 : 800
Anti- Vimentine Clone 22352 (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc California, USA	1 : 500	1 : 300
Anti- $\alpha$ tubuline clone B-5-1-2 (souris)	Sigma Missouri, USA	1 : 30 000	---
Anti- GAPDH Clone 14433 (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc California, USA	1 : 30 000	---
Anti-souris et Anti-lapin IgG couplé à HRP	Cell Signaling Technology Massachusetts, USA	1 : 3000	---
Alexa fluor anti-mouse et anti-lapin IgG F(ab') <sub>2</sub>	Invitrogen California, USA	---	1 : 500

## 16. Exposition des cellules aux différents facteurs de croissance

Pour certains essais de migration et de immunobuvardage de type western, les cellules NIH : OVCAR-3 ont été exposées à différents facteurs de croissance, soit le facteur de croissance épidermal (EGF), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF $\beta$ ). Dans le cas des blessures de la monocouche, les cellules NIH : OVCAR-3 de la lignée parentale, les clones contrôles KDEL 4 : 5 #12 et les clones KDEL 1 : 9 # 7 et # 9 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits afin d'obtenir une confluence

d'environ 100% le lendemain. La blessure de la monocouche de cellules a été faite et les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture sans sérum et sans insuline, contenant 30 mM d'hydroxyurée, 10, 20 ou 40 ng/mL de EGF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), 20 ng/mL de HGF (MJS BioLynx Inc Brockville, Ontario) ou 10 ng/mL TGF $\beta$ 1 (PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ) selon l'expérience. Des incubations avec du milieu de culture complet et avec du milieu sans sérum, toujours contenant de l'hydroxyurée, ont servis comme contrôles. Les plaques ont été incubées à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Des photos des puits ont été prises immédiatement après le traçage de la croix (temps= 0h) et à 24 heures pour observer la migration des cellules dans l'espace créé par la blessure.

#### **17. Exposition des cellules aux divers inhibiteurs des molécules de signalisation**

Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR : AG1478 et PD153035, ont été obtenus de Calbiochem Corp. (San Diego, CA). Les cellules NIH: OVCAR-3 ont été exposées aux différents inhibiteurs à une concentration de 4 $\mu$ M pour AG1478 et 5 $\mu$ M pour PD153035 pendant 24 heures avant de faire les analyses. Les autres conditions de contrôle ont été traitées selon la façon décrite dans les sections précédentes.

## RÉSULTATS

Les différents modèles cellulaires construits dans le laboratoire serviront à vérifier l'influence de CA125 et de ces domaines structuraux dans la fonctionnalité des complexes de jonctions intercellulaires, dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le potentiel de migration des cellules de cancer de l'ovaire.

### **18. Évaluation des capacités migratoires du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)**

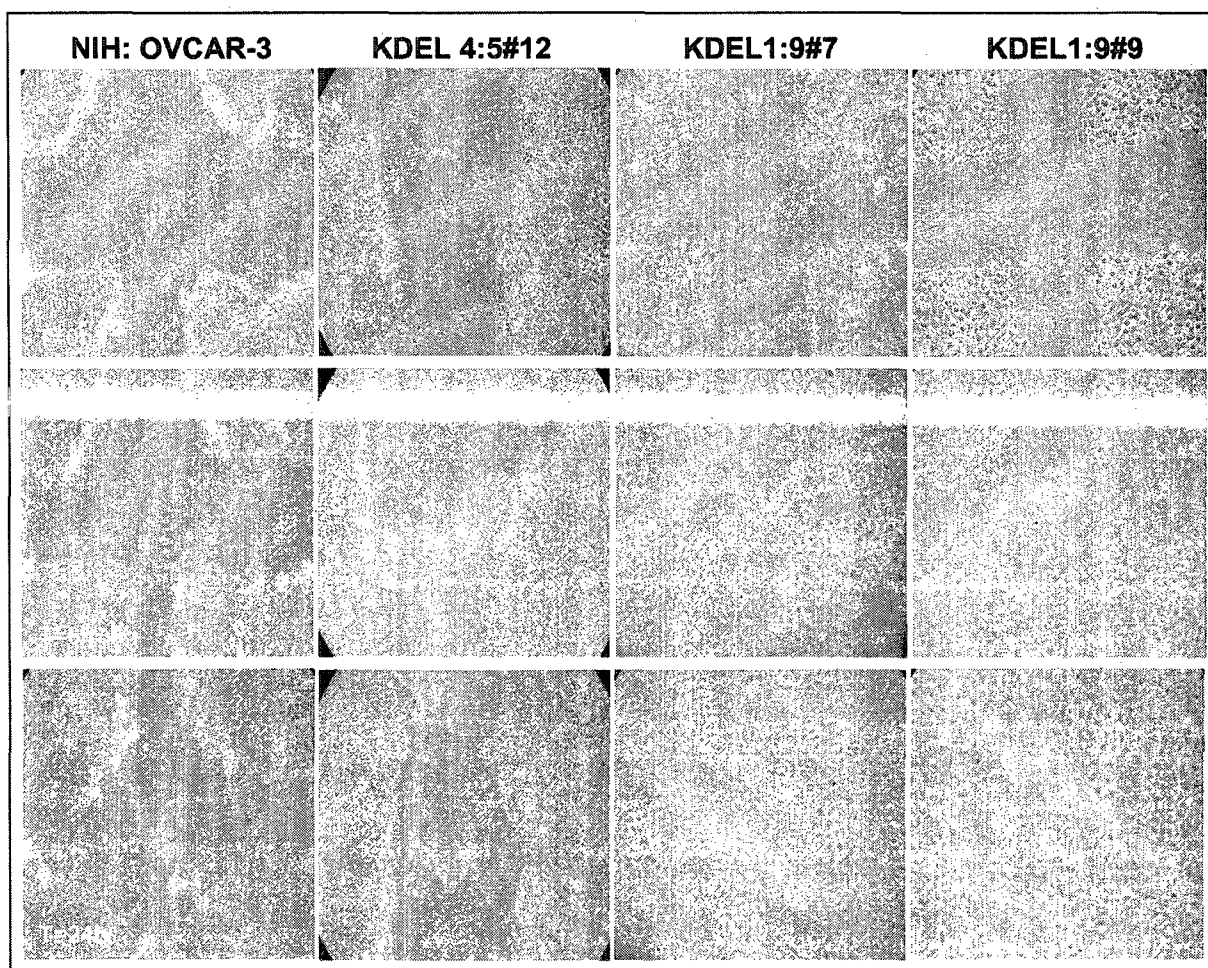
Suite aux observations obtenues antérieurement dans notre laboratoire comme les changements dans la morphologie cellulaire, l'augmentation de l'expression du gène et des niveaux de la protéine CD44 ainsi que l'augmentation de la sécrétion, de l'activation et de l'expression de la proMMP2 des clones KDEL 1 :9#7 et #9 qui n'expriment plus CA125 à la membrane cellulaire, nous avons voulu vérifier si les cellules avaient acquis une plus grande capacité migratoire. Pour ce faire, nous avons utilisé deux approches différentes fréquemment utilisées pour évaluer cette capacité.

La première méthode, le "scratch essai" ou "blessure de la monocouche", produit des résultats qualitatifs. La figure 22 montre d'abord qu'au temps 0, la blessure entre chacune des monocouches était comparable. À 6 et 24 heures on peut voir que la lignée parentale n'a pas réussi à combler le trou formé par la marque. Par contre, les deux clones OVCAR

-3 KDEL 1 :9#7 et #9 ont commencé à remplir les extrémités de la croix après 6 heures seulement en plus d'avoir complètement recouvert celle-ci après 24 heures d'incubation.

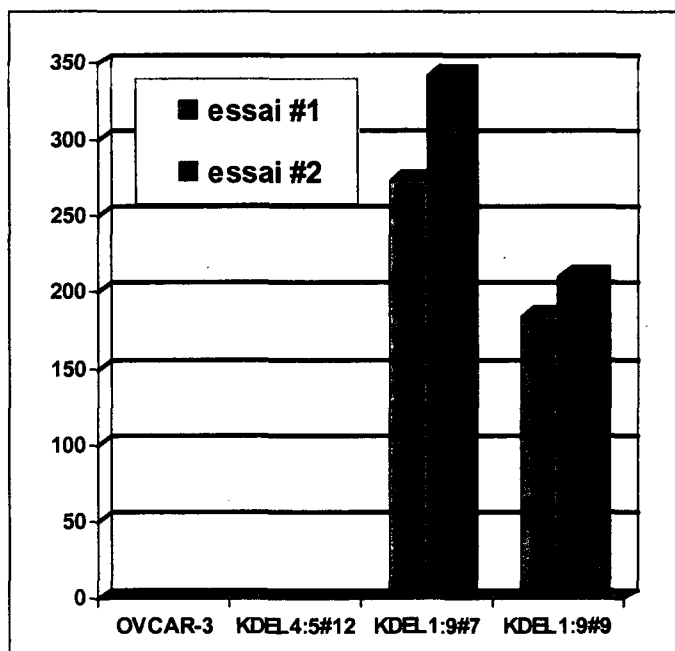
**Figure 22 : Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle perte de fonction (CA125 knockdown)**

Les cellules ont étéensemencées de manière à obtenir une monocouche à 100% de confluence. À l'aide d'un embout de 10 µL, une marque cruciforme a été générée. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu contenant de l'hydroxyurée (agent antiprolifératif). Des photos de la blessure démontrant la migration des cellules ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0, 6h et 24 h suite à la blessure.



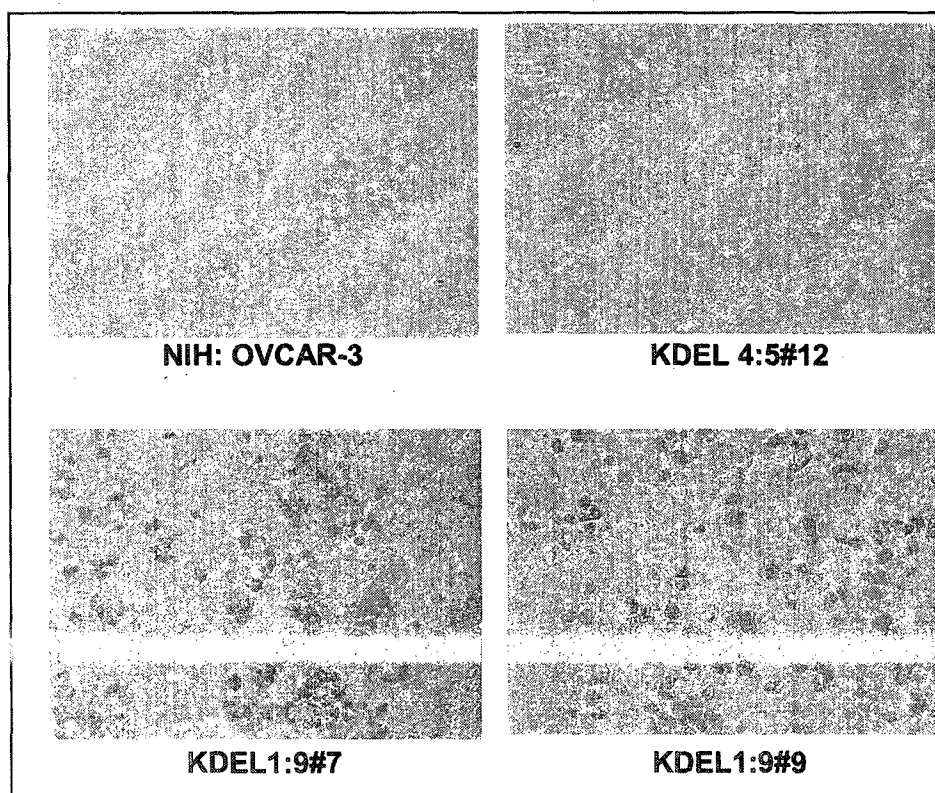
La deuxième méthode consiste à utiliser des Chambres de Boyden avec des membranes poreuses comportant des pores de 8µm pour mesurer la capacité des cellules à se déplacer en présence d'un chimioattractant, le sérum dans cette expérience. Il s'agit d'une méthode plus exacte et permet d'évaluer de façon quantitative le potentiel migratoire des cellules. Dans deux essais indépendants, nous avons observé une augmentation très importante de la motilité des cellules CA125 knockdown. On peut constater que dans les membranes utilisées pour la lignée parentale NIH : OVCAR-3 et la lignée contrôle KDEL 4 :5#12 il n'y a pas de cellules colorées, à la différence des membranes des clones KDEL 1 :9#7 et #9 pour lesquelles on est capable de voir et de dénombrer plusieurs cellules qui ont traversées la membrane. L'abolition de l'expression de CA125 à la membrane des cellules OVCAR-3 semble donc activer le potentiel migratoire de ces cellules.

**Figure 23 : Dénombrement des cellules du modèle perte fonction ayant traversées les membranes poreuses des chambres de Boyden**



**Figure 24 : Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden chez les cellules CA125 knockdown**

Dans chacune des chambres de Boyden, 15000 cellules ont étéensemencées et incubées à 37°C pendant 24 heures. Le FBS a été utilisé comme chimioattractant. Les cellules ont été fixées au méthanol et colorées avec du cristal violet 1%. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500.





## **19. Analyse des protéines des jonctions cellulaires et du cytosquelette du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)**

Lors de la progression tumorale, les cellules épithéliales acquièrent un phénotype semblable aux fibroblastes, une capacité de dissociation les unes des autres et de migration. Nous avons voulu évaluer si l'abolition de CA125 à la membrane cellulaire entraînait des changements au niveau des interactions cellule-cellule et du cytosquelette qui pourraient induire la série d'événements nécessaires pour engendrer une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

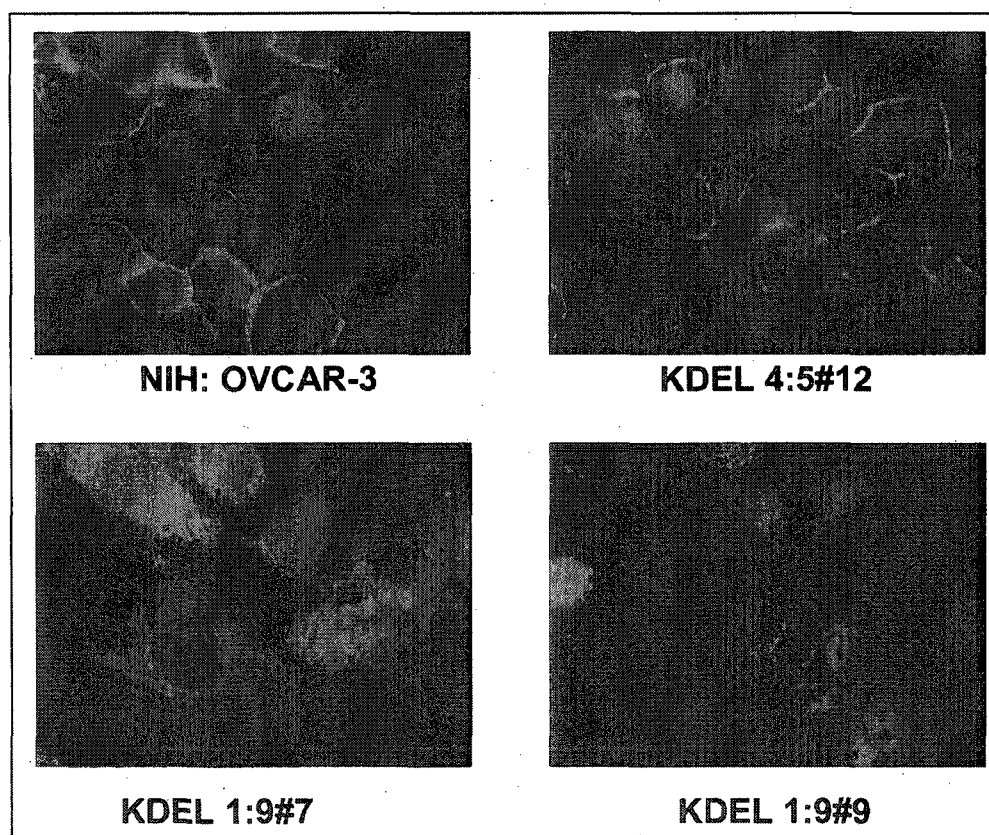
### **19.1 Changement de la localisation et de l'expression d'E-cadhérine dans les cellules CA125 knockdown**

Dans la figure 25, le signal rouge d'immunofluorescence détecté indique l'expression et la localisation de l'E-cadhérine, la protéine la plus importante des jonctions adhérentes des cellules épithéliales. E-cadhérine est exprimée en abondance et bien localisée à la membrane plasmique des cellules NIH : OVCAR-3 et dans notre contrôle ScFv KDEL 4 :5#12. On y observe sa distribution régulière et bien limitée autour des cellules. Dans les clones 1 :9#9 et 1 :9#7 qui n'expriment plus CA125 à la surface des cellules, on trouve un patron d'expression d'E-cadhérine complètement différent. Le signal rouge n'est détecté qu'au niveau cytoplasmique. Dans le clone KDEL 1 :9 #9 en plus de la localisation d'E-cadhérine à l'intérieur de la cellule, on observe aussi une diminution générale de cette expression.

Un co-marquage d'E-cadhérine (en rouge) et du réticulum endoplasmique (en vert) montre que l'E-cadhérine internalisée ne se retrouve pas dans la voie de sécrétion, c'est-à-dire, le réticulum endoplasmique mais plutôt possiblement dans des vésicules d'internalisation (figure 26).

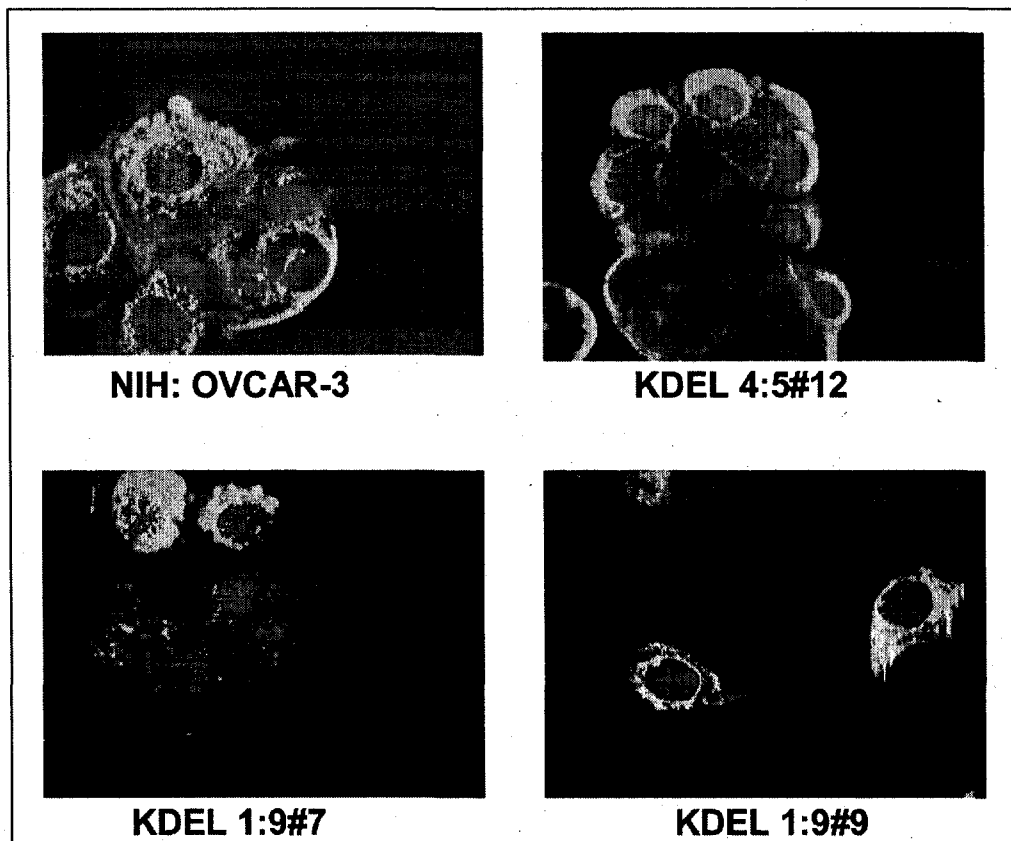
**Figure 25 : Immunofluorescence de l'E-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-E-cadhérine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 26 : Co-marquage de l'E-cadhérine et du réticulum endoplasmique**

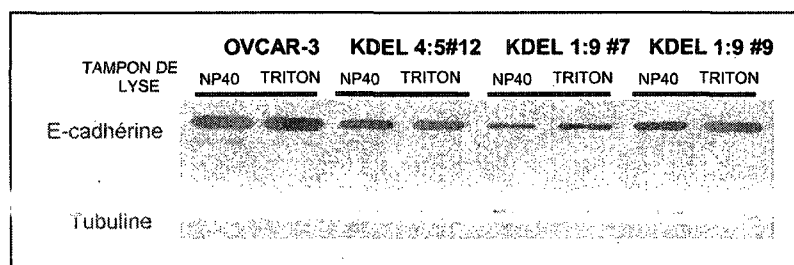
Les cellules ont été ensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-E-cadhérine (rouge), anti-calréticuline (vert), la calréticuline étant une protéine en abondance dans le RE et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



L'immunobuvardage de type Western a été effectué afin d'évaluer les niveaux protéiques de E-cadhérine chez les différents clones stables. Selon les résultats obtenus, l'E-cadhérine serait moins exprimée chez les clones CA125 knockdown (figure 27). Cette perte d'E-cadhérine à la membrane et la diminution de son expression suggère une disparition des jonctions adhérentes et donne un premier indice de la possibilité d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) chez les cellules CA125 knockdown.

**Figure 27 : Immunobuvardage de type Western pour l'E-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Sur un gel 7,5% d'acrylamide, 10 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. Deux différents tampons de lyse (NP40 et Triton X-100) ont été utilisés afin d'optimiser l'extraction des protéines. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant comme contrôle de la quantité de protéines chargées.



**19.2 Modification de la localisation et de l'expression de claudine-7 dans les clones CA125 knockdown**

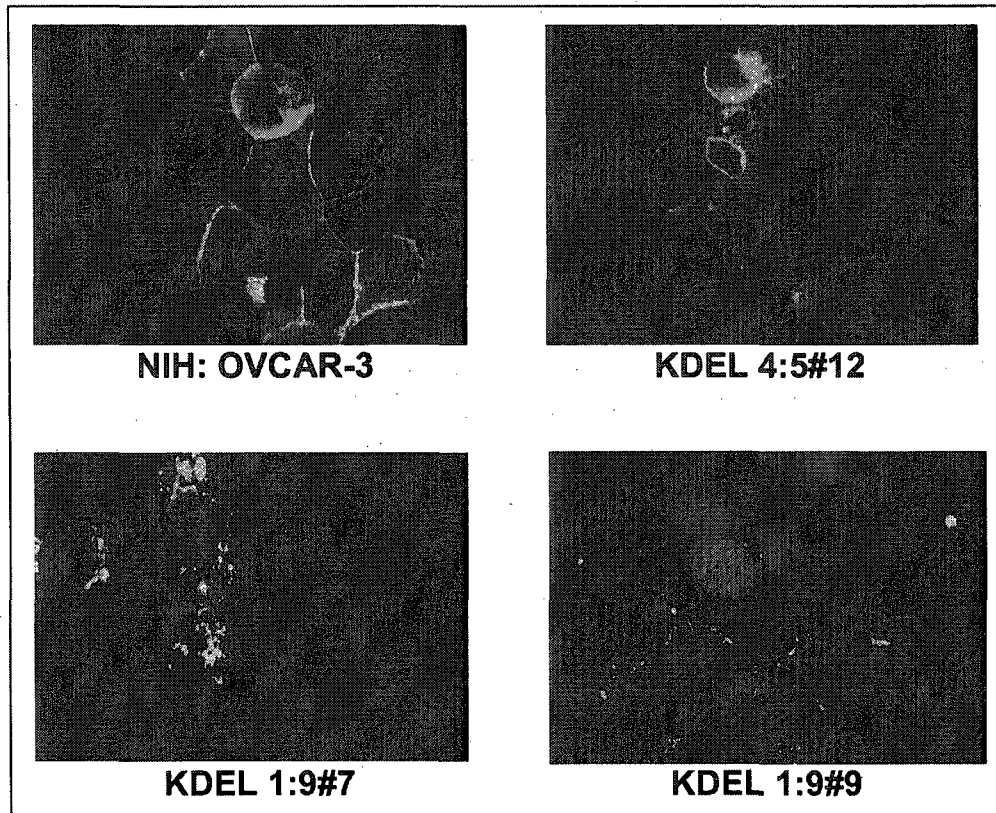
Pendant la transformation tumorale, les cellules tumorales perdent typiquement les fonctions de leurs jonctions serrées amenant à une altération de l'intégrité épithéliale et une perte de la polarité cellulaire. Les modifications d'une des molécules clé des jonctions serrées, la

claudine-7, a été analysée par immunofluorescence indirecte et par immunobuvardage de type Western.

L'expression et la distribution de claudine-7 des cellules de la lignée cancéreuse de l'ovaire NIH : OVCAR-3 ainsi que le clone ScFv contrôle KDEL 4:5#12 montrent, par immunofluorescence indirecte, un patron concordant à la distribution attendue pour des cellules épithéliales. Claudine-7 est exclusivement détectée à la membrane des cellules. Chez les clones CA125 knockdown, claudine-7 est internalisée et elle se trouve confinée au compartiment cytoplasmique, surtout chez le clone KDEL 1:9 #7. Le clone KDEL 1:9 #9 montre un patron plutôt membranaire mais le signal est beaucoup moins intense, discontinu et irrégulier (Figure 28). L'immunobuvardage de type Western démontre que la suppression de CA125 à la membrane des cellules de cancer de l'ovaire amène à une diminution de l'expression de claudine-7 (figure 29). Ces modifications de la claudine-7 suggèrent la perte des jonctions serrées chez les cellules qui n'expriment pas CA125 à la membrane plasmique.

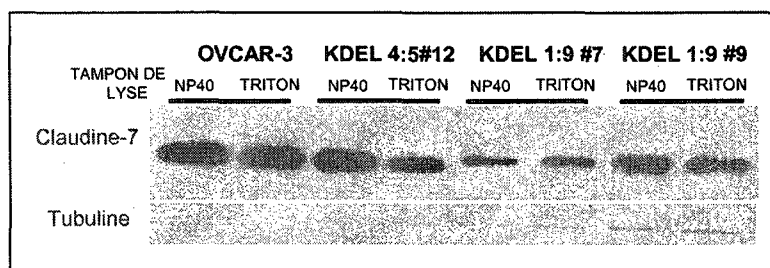
**Figure 28 : Immunofluorescence de claudine-7 chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-claudine-7 (vert) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 29 : Immunobuvardage de type Western pour la claudine-7 chez les cellules du modèle perte de fonction**

Sur un gel d'acrylamide 15%, 10µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. Deux différents tampons de lyse (NP40 et Triton X-100) ont été utilisés afin d'optimiser l'extraction des protéines. La membrane a aussi été révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant de contrôle de la quantité de protéines chargées.



**19.3 Modifications observées de certaines protéines du cytosquelette dues à la perte de CA125 de la membrane cellulaire**

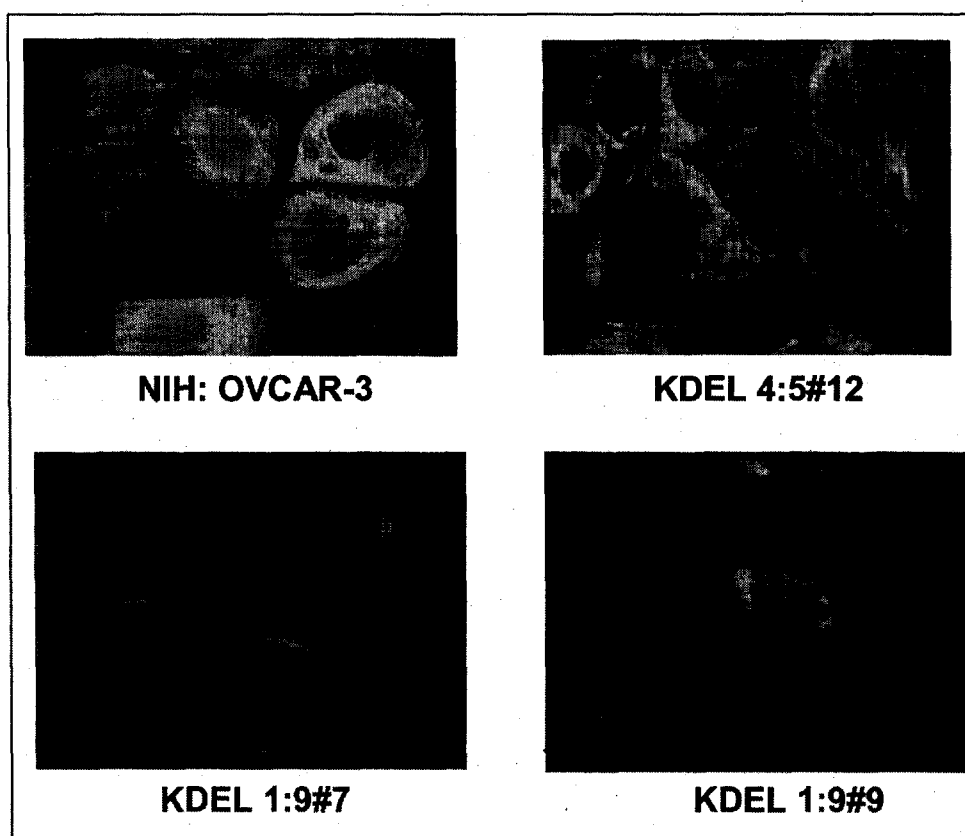
**19.3.1 Cytokératines 8 et 18**

Parmi les différents constituants qui forment le cytosquelette des cellules nous avons analysé premièrement les cytokératines 8 et 18. Il s'agit d'une protéine cytoplasmique qui constitue les filaments intermédiaires au niveau des tissus épithéliaux et possède un rôle important dans le maintien de la polarité cellulaire. Comme on peut observer dans la figure 30, le marquage des cytokératines 8 et 18 est très fort et intense dans le cytoplasme des cellules de la lignée parentale du cancer épithéliale de l'ovaire NIH : OVCAR-3 et chez le clone contrôle 4 :5 #12. Par contre, ce marquage est moins intense chez les cellules qui ont perdu

l'expression de CA125 à la membrane cellulaire. Ce résultat suggère une modification du cytosquelette qui pourrait indiquer la perte de polarité cellulaire chez les cellules CA125 négatives.

**Figure 30 : Immunofluorescence des cytokératines 8 et 18 chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont été ensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-cytokératines 8 et 18 (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



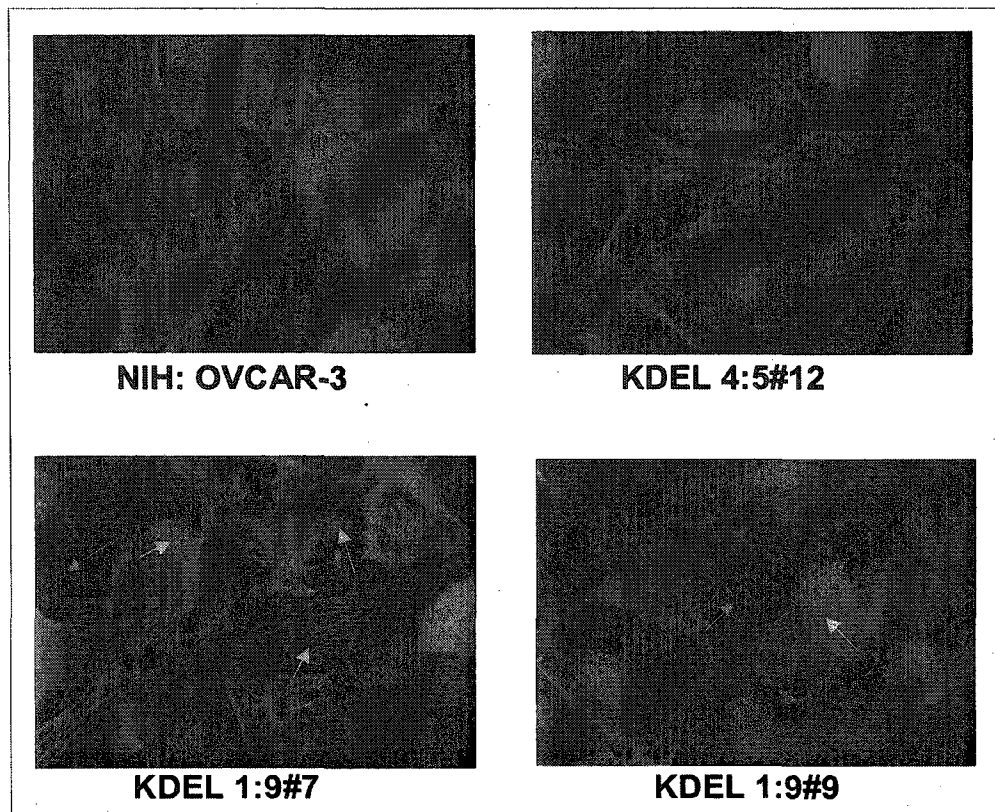


### 19.3.2 F-actine

Pendant le processus d'EMT, il existe une importante réorganisation du cytosquelette qui mène à une perte de la polarité basoapicale et à l'acquisition de motilité cellulaire. Nous avons analysé les changements du cytosquelette d'actine causés par la perte d'expression de CA125 à la membrane des cellules NIH : OVCAR-3. L'immunofluorescence de la F-actine chez les cellules parentales et chez les contrôles ScFv KDEL 4 :5 #12 nous montre le patron caractéristique des cellules épithéliales avec des structures sub-corticales d'aspect maillées formées des microfilaments d'actine qui donnent une polarité apicobasale aux cellules. Cette organisation de la F-actine est perdue chez les clones CA125 knockdown, où on trouve un réarrangement du cytosquelette notable avec la création des fibres de stress (flèches vertes), et l'émission des processus membranaires : des filopodes et des lamellipodes (flèches mauves) (figure 31). Ces données évoquent que l'abolition de l'expression de CA125 à la membrane entraîne la perte de polarité cellulaire et à l'acquisition d'un potentiel migratoire chez ces cellules.

**Figure 31 : Immunofluorescence de la F-actine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-F-actine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



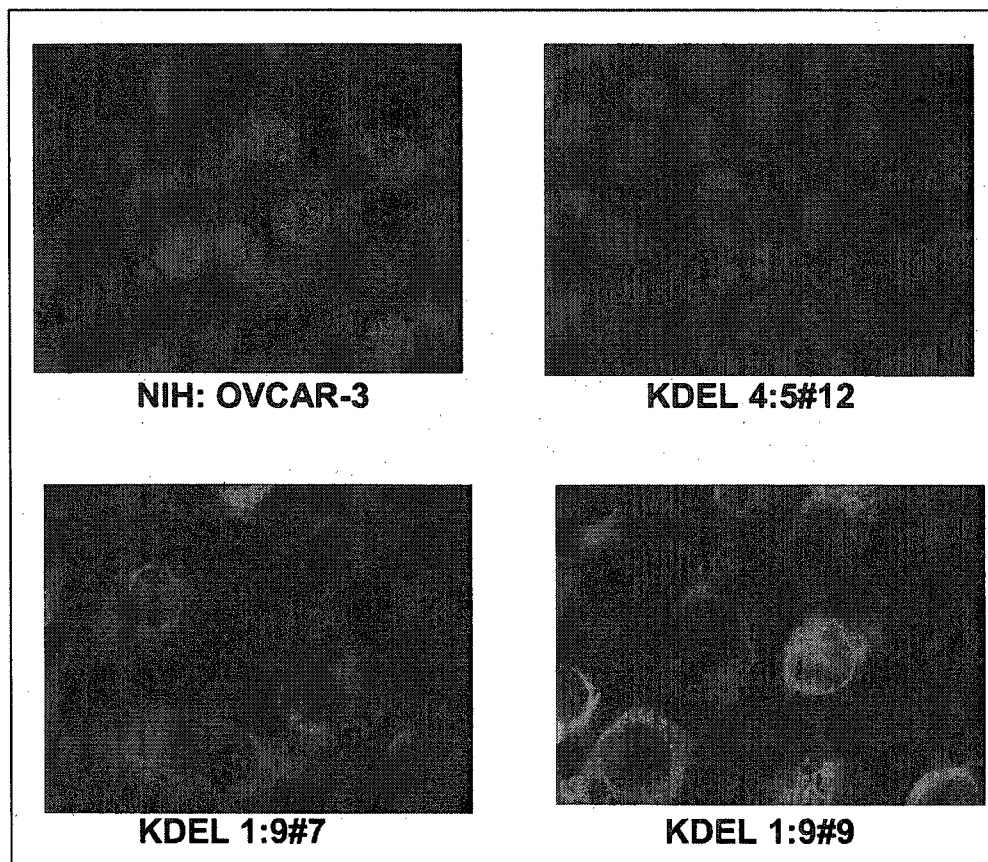
## **19.4 Expression des marqueurs mésenchymateux chez les cellules du cancer de l'ovaire CA125 knockdown**

### **19.4.1 Vimentine**

Le dernier élément que nous avons voulu observer était la manifestation des différents marqueurs mésenchymateux chez notre modèle perte de fonction tels que la vimentine et la N-cadhérine. La figure 32 démontre une absence complète de la protéine vimentine chez les cellules exprimant CA125 à la membrane. Par contre, chez les cellules qui n'expriment pas CA125 à la membrane, le signal de fluorescence obtenue avec l'anticorps anti-vimentine apparaît très intense et démontre son patron caractéristique en traversant toute la longueur de la cellule. L'immunobuvardage de type Western effectué avec ces mêmes cellules nous confirme l'expression de la vimentine chez les clones KDEL 1 :9 #7 et KDEL 1 :9 #9 où CA125 n'est plus présent à la membrane cellulaire (figure 33). Ces résultats montrent l'apparition des marqueurs mésenchymateux lorsqu'on fait un knockdown de CA125 chez les cellules épithéliales OVCAR-3. Ceci pourrait indiquer la manifestation d'un processus d'EMT chez ces cellules.

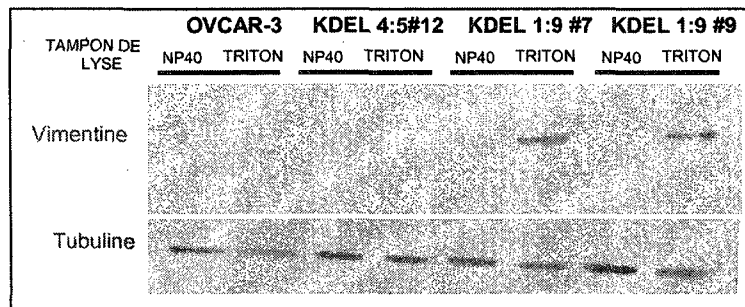
**Figure 32 : Immunofluorescence de la vimentine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont été ensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps vimentine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 33 : Immunobuvardage de type Western de la vimentine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Sur un gel 12% d'acrylamide, 10 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. Deux différents tampons de lyse (NP40 et Triton X-100) ont été utilisés afin d'optimiser l'extraction des protéines. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant comme contrôle de la quantité de protéines chargées.



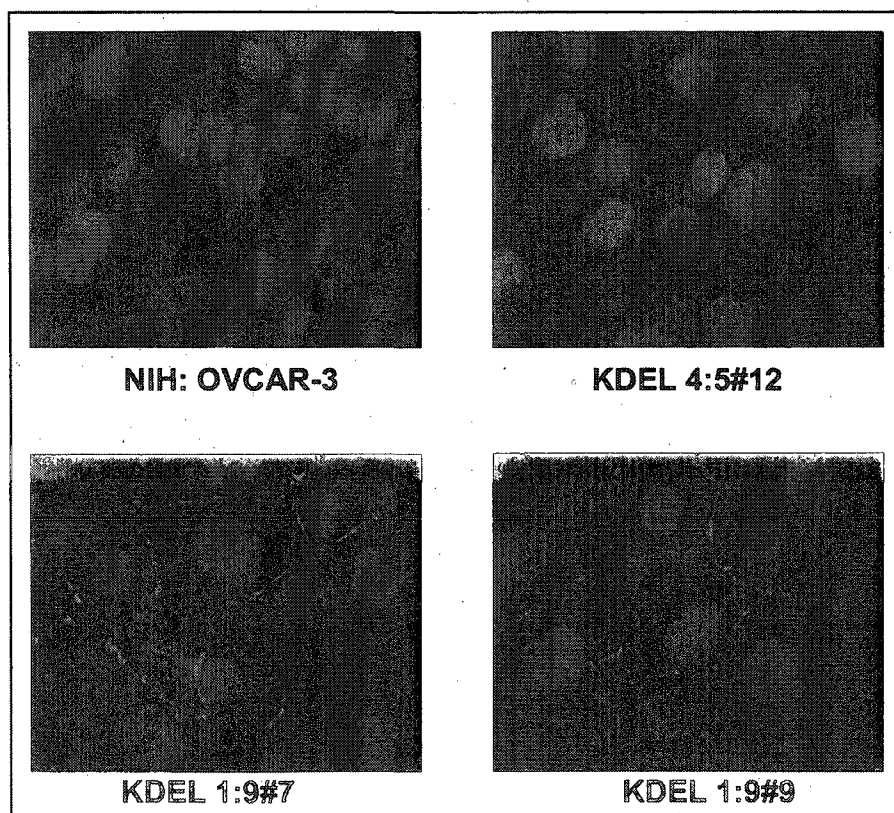
**19.4.2 N-cadhérine**

Basé sur des études récentes démontrant que des cadhérines mésenchymateuses, en particulier N-cadhérine, augmentent la motilité des cellules tumorales et la migration, donc, l'effet opposé observé avec E-cadhérine (HAZAN et al, 2000 et TRAN et al, 1999), nous avons voulu constater l'expression de novo de N-cadhérine chez les clones CA125 knockdown. Nous avons remarqué par immunofluorescence et par immunobuvardage de type Western que la N-cadhérine n'est pas présente dans la lignée parentale ni dans notre contrôle 4:5#12. Par contre, l'expression de N-cadhérine est retrouvée chez les clones CA125 knockdown 1:9#9 et 1:9#7. L'immunofluorescence avec l'anticorps anti-N-cadhérine met en évidence sa localisation membranaire. Elle révèle un patron régulier, tout autour de la cellule et dans presque toutes les cellules exposées (figure 34). De la même façon, les bandes

de l'immunobuvardage exprimant les niveaux de la protéine sont détectés seulement dans les cellules CA125 knockdown (figure 35). Ces résultats suggèrent que la perte de CA125 des cellules OVCAR-3 confère à ces cellules l'apparition des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la N-cadhérine présentes lors du processus d'EMT.

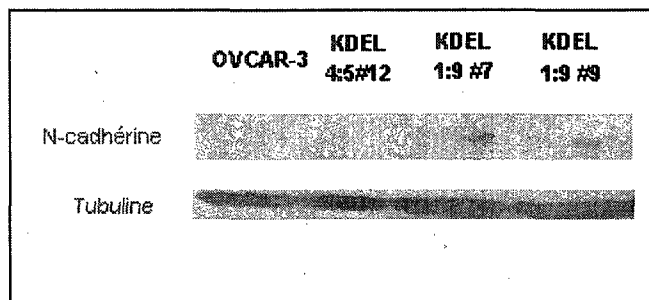
**Figure 34 : Immunofluorescence de la N-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-N-cadhérine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 35 : Immunobuvardage de type Western pour la N-cadhérine chez les cellules du modèle perte de fonction**

Sur un gel 7,5% d'acrylamide, 15 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant de contrôle de la quantité de protéines chargées:



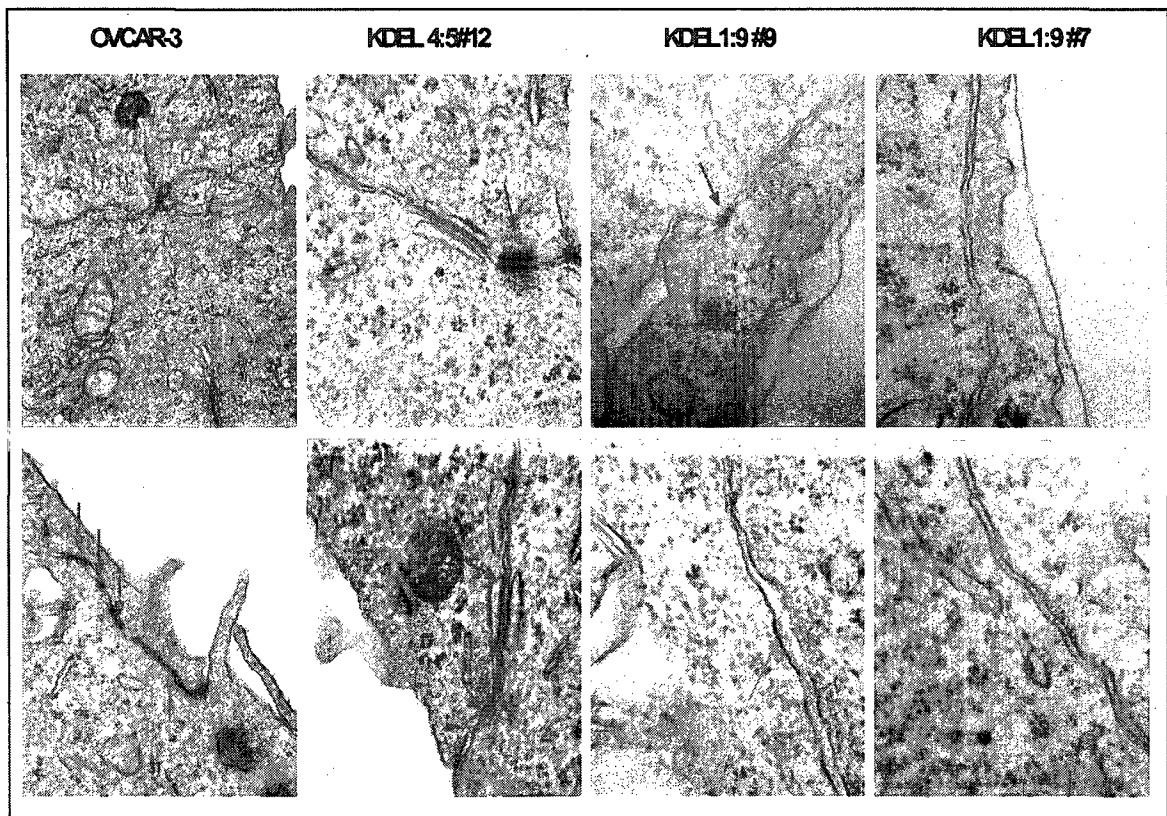
**20. Caractérisation des jonctions cellulaires par microscopie électronique chez le modèle perte de fonction de CA125.**

Les jonctions cellulaires de la lignée parentale et des différents clones ont été observées par microscopie électronique. Nous avons pu reconnaître plusieurs structures qui connectent des cellules adjacentes chez la lignée parentale OVCAR-3 et chez le clone contrôle ScFv. Des desmosomes et des jonctions adhérentes ont été facilement identifiés et photographiés avec des grossissements de 100 000X et 120 000X. À la différence des cellules décrites antérieurement, les clones CA125 knockdown montrent très peu ou presque pas de complexes de jonctions. Nous avons pu aussi constater que le contact intercellulaire des cellules OVCAR-3 et du clone contrôle est étroit, serré et il est difficile d'observer un espace

entre les cellules. Au contraire, chez les clones KDEL 1 : 9#7 et #9, cet espace s'agrandit, et nous pouvons bien différencier les deux membranes qui forment cette interaction cellule-cellule plus lâche et plus faible (figure 36). Ces images montrent que les cellules du cancer de l'ovaire OVCAR-3 ont perdu des complexes de jonction cellulaire lorsque suite à l'abolition de l'expression de CA125 à la membrane plasmique.

**Figure 36 : Microscopie électronique des cellules du modèle perte de fonction**

Les cellules ont été observées à des grossissements de 100 000X ou 120 000X. Flèche rouges : complexes de jonction. Flèche vert : espace intercellulaire.





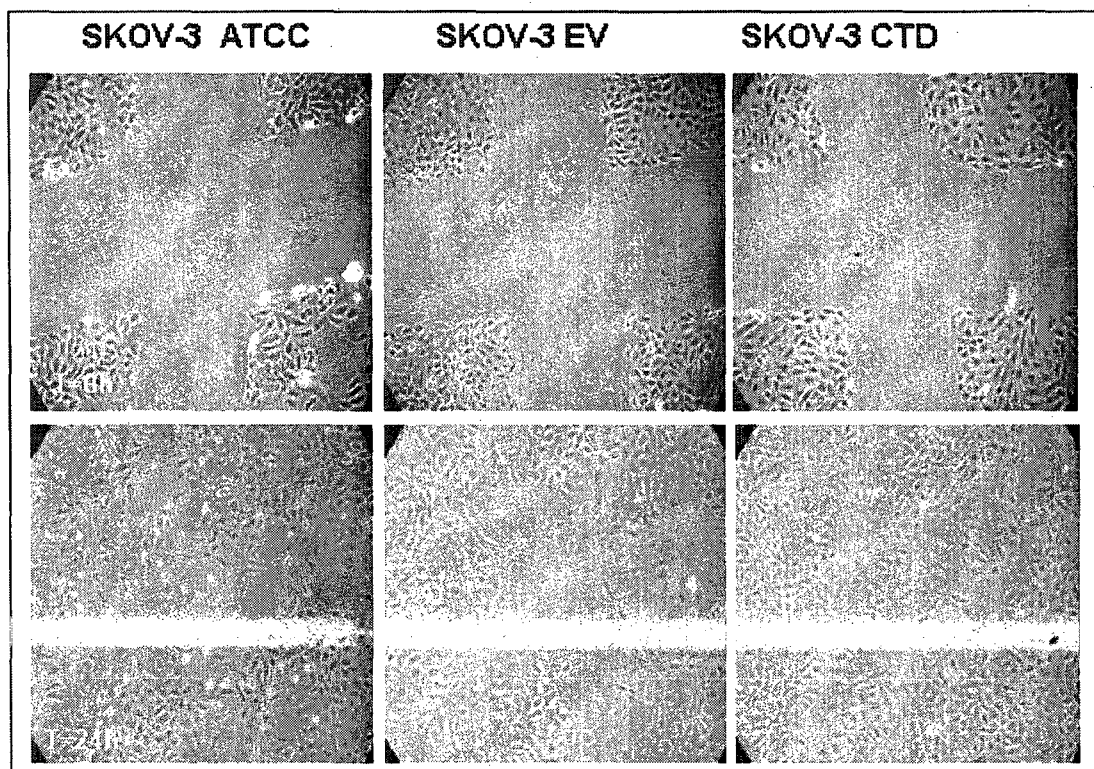
## **21. Évaluation des capacités migratoires du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125: SKOV-3 CTD)**

Pour les expériences suivantes nous utilisons les cellules SKOV-3 (lignée parentale), la population stable contrôle (exprimant le plasmide seul, EV) et la population stable CTD. Les cellules SKOV3 sont considérées comme étant des cellules ayant un potentiel migratoire modéré. Nous avons voulu déterminer si le gain de fonction (expression du domaine CTD de CA125) pourrait avoir une influence sur ce phénomène impliquant possiblement le domaine cytoplasmique de CA125.

L'essai de migration par blessure de la monocouche constitue un essai dont le résultat est qualitatif mais donne tout de même une idée du potentiel migratoire des cellules. La figure 37 montre d'abord qu'au temps 0, toutes les blessures des monocouches des différentes populations sont comparables. Après 24 heures d'incubation on observe que plusieurs cellules de la lignée parentale SKOV-3 ATCC et de la population contrôle SKOV-3 EV se sont déplacées des bords de la croix en migrant vers le centre de la blessure. Les cellules de la population SKOV-3 CTD ont été capables de migrer d'une façon plus importante et remarquable et ainsi en mesure de remplir complètement la blessure de la monocouche cellulaire.

**Figure 37 : Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125**

Les cellules ont étéensemencées de manière à obtenir une monocouche à 100% de confluence. À l'aide d'un embout de 10  $\mu$ L, une marque cruciforme a été générée. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu contenant de l'hydroxyurée (agent antiprolifératif). Des photos de la blessure montrant la migration des cellules ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0 et 24 h suite à la blessure.

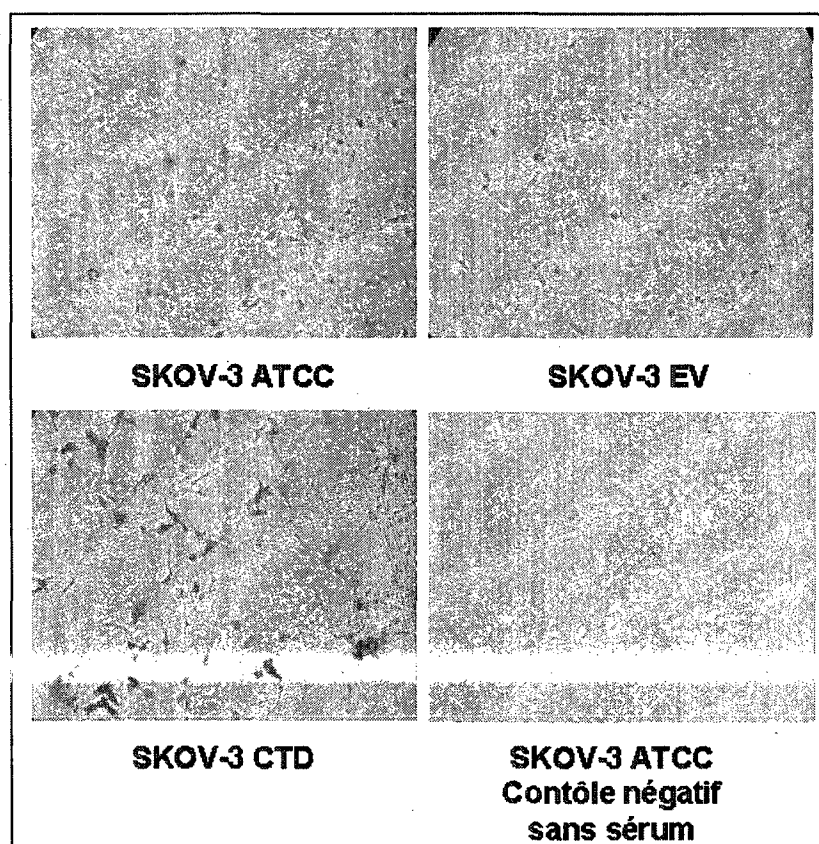


De la même façon que pour le modèle perte de fonction, nous avons considéré une autre méthode pour vérifier la capacité de migration de cellules. L'essai de chambres de Boyden nous a permis de définir de manière quantitative les cellules ayant traversées les membranes poreuses vers l'agent chimioattractant qui se trouvait en-dessous de cette membrane. Dû au

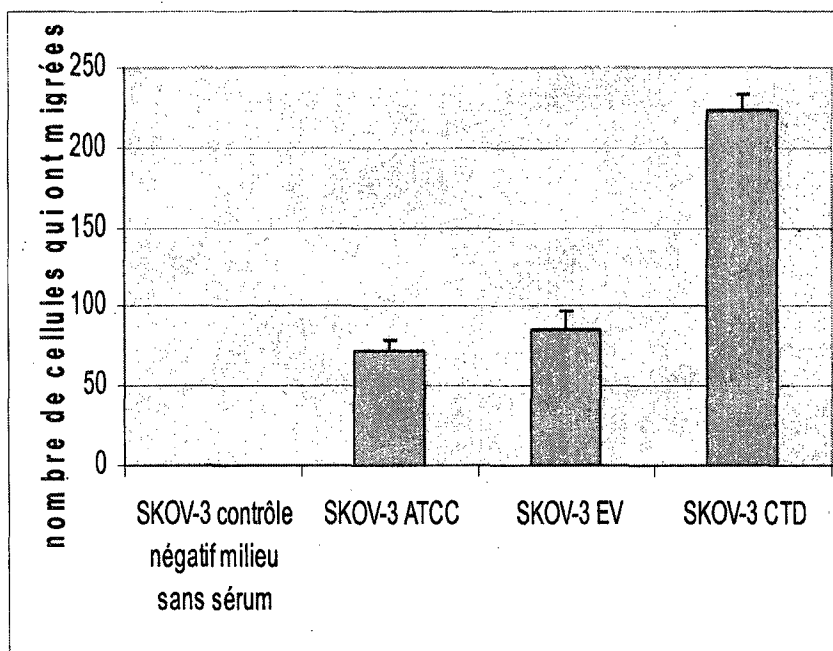
fait que les cellules SKOV-3 ont un certain potentiel de migration, dans cette expérience nous avons créé un contrôle négatif. Du milieu sans sérum a été ajouté sous une des membranes. De cette façon les cellules ne possèdent pas le chimioattractant nécessaire qui favoriserait le déplacement des cellules. Comme attendu, aucune cellule du contrôle négatif n'a été capable de migrer à travers de la membrane (Figure 38). Lorsque nous avons dénombré les cellules, nous avons constaté plus que le double des cellules de la population SKOV-3 CTD ayant traversées la membrane poreuse des Chambres de Boyden. La figure 39 montre entre 60 et 80 cellules de la lignée parentale et du contrôle SKOV-3 EV par champ de microscope qui ont migrées à différence des cellules de la population SKOV-3 CTD où nous en avons dénombré plus de 200 cellules. Les deux dernières expériences nous permettent de déterminer un impact positif sur le potentiel migratoire de la lignée cellulaire SKOV-3 quand nous exprimons le domaine CTD de CA125 chez ces cellules.

**Figure 38 : Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden chez les cellules exprimant le domaine CTD de CA125**

Dans chacune des chambres de Boyden, 15000 cellules ont étéensemencées et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les cellules ont été fixées au méthanol et colorées avec du cristal violet 1%. Les photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500. Grossissement 10X. Le contrôle négatif ne contient pas de chimioattractant.



**Figure 39 : Dénombrement des cellules du modèle gain fonction exprimant le domaine CTD de CA125 dans un essai de migration à l'aide des chambres de Boyden**



## **22. Analyse des modifications des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux chez les cellules du modèle gain de fonction (expression des domaines cytoplasmiques de CA125)**

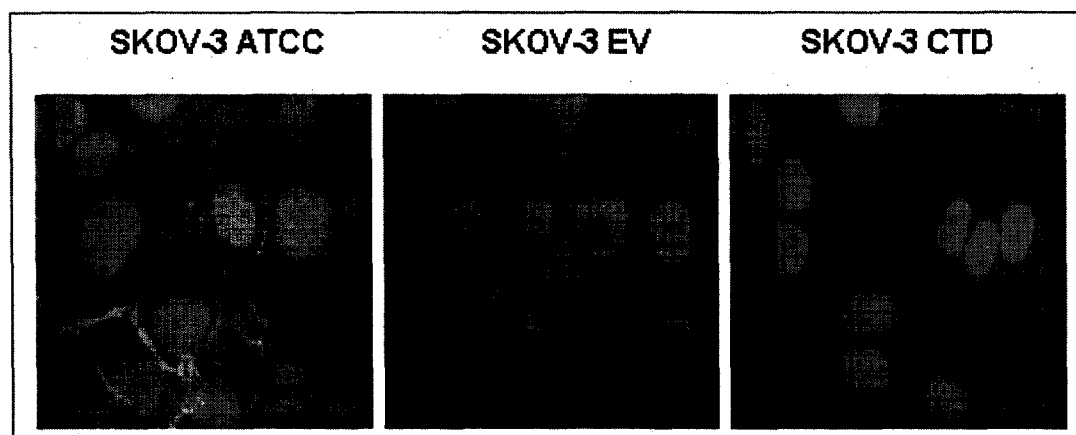
Dans le but de déterminer l'impact des différents domaines de CA125 sur les interactions cellule-cellule, nous avons premièrement utilisé les populations stables exprimant le domaine CTD de CA125. Nous avons analysé des variations possibles du phénotype de ces cellules sur le potentiel métastatique des cellules cancéreuses. Nous avons considéré importante l'analyse des modifications des marqueurs de type épithéliaux et mésenchymateux étant donné qu'ils sont les changements majeurs lors de l'EMT.

## **22.1 Changement de l'expression d'E-cadhérine et claudine-7 chez la population SKOV-3 CTD**

À fin d'étudier le processus d'EMT chez nos cellules de cancer de l'ovaire, nous avons évalué le rôle potentiel accompli par le domaine CTD de CA125 sur les cellules SKOV-3. Comme montré dans les images d'immunofluorescence et d'immunobuvardage de type Western, nous avons remarqué que l'addition de cette portion de CA125 chez les cellules SKOV-3 entraîne une importante diminution de E-cadhérine et de claudine-7. La lignée parentale SKOV-3 ATCC ainsi comme la population contrôle SKOV-3 EV démontre par immunofluorescence une distribution membranaire, régulière et caractéristique de E-cadhérine qui est complètement perdue chez la population SKOV-3 CTD (Figure 40). L'immunobuvardage de type Western nous confirme aussi l'atténuation des niveaux protéiques de E-cadhérine et claudine-7 chez la population cellulaire SKOV3-CTD (Figure 41).

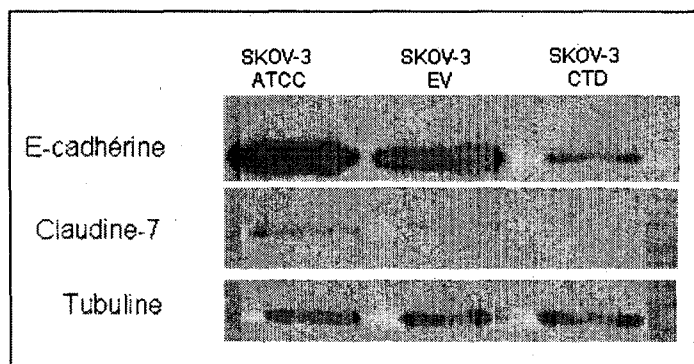
**Figure 40 : Immunofluorescence de l'E-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125**

Les cellules ont été ensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-E-cadhérine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 41 : Immunobuvardage de type Western pour E-cadhérine et claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125**

Sur un gel 7,5% ou 15% d'acrylamide, 15 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant de contrôle de la quantité de protéines chargées.



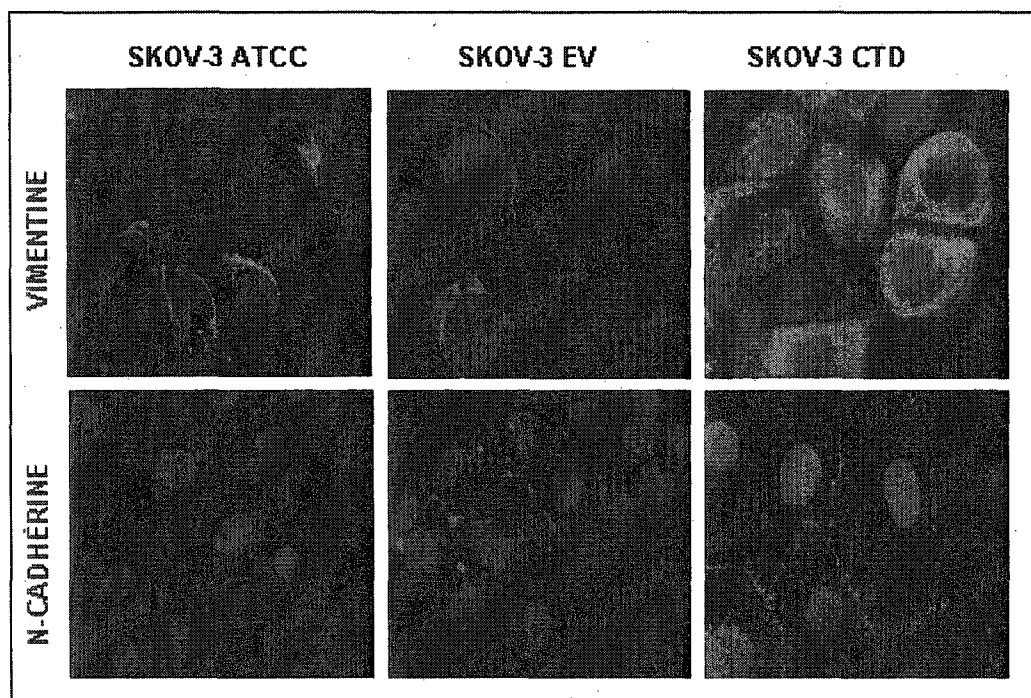
## **22.2 Changement de l'expression de vimentine et N-cadhérine chez la population SKOV-3 CTD**

De la même façon que nous avons examiné des marqueurs mésenchymateux chez les cellules CA125 knockdown, nous les avons analysés chez la population qui exprime le domaine CTD de CA125. Le patron d'expression de la vimentine et la N-cadhérine a été évalué chez les différentes populations. Les résultats obtenus par immunofluorescence et par immunobuvardage de type Western indiquent une augmentation des niveaux d'expression de la vimentine et de la N-cadhérine chez la population cellulaire SKOV-3 CTD (Figures 42 et 43). Une certaine quantité de cellules de la lignée SKOV-3 ATCC et de la population SKOV-3 EV sont faiblement positives pour ces marqueurs mésenchymateux à différence de l'expression plus forte retrouvée chez les cellules exprimant le domaine CTD de CA125. Toutes ces données ensemble nous suggèrent que le domaine CTD de CA125 pourrait être un régulateur positif du potentiel métastatique des cellules de cancer de l'ovaire en considérant les modifications qu'il apporte aux cellules SKOV-3 au niveau de molécules des jonctions cellulaires et des marqueurs d'EMT associés à ce processus.



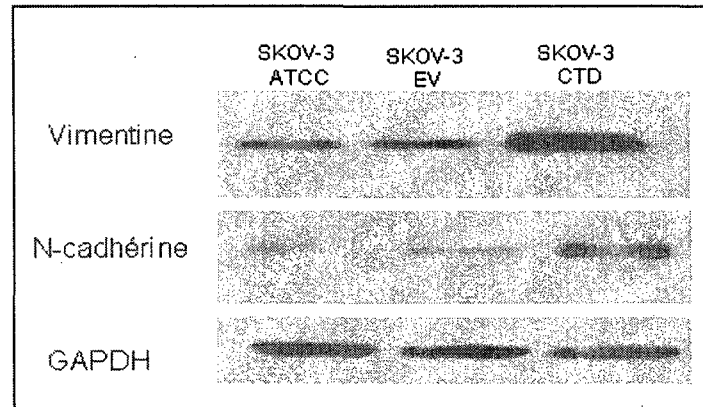
**Figure 42 : Immunofluorescence de la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-vimentine (rouge), anti-N-cadhérine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 43 : Immunobuvardage de type Western pour la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant le domaine CTD de CA125**

Sur un gel 12% ou 7,5% d'acrylamide, 15 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-GAPDH servant de contrôle de la quantité de protéines chargées.



**23. Évaluation des capacités migratoires du modèle gain de fonction (expression des domaines unique et unique + 1 répétition de CA125 : SKOV-3 TMU et TMU+1R)**

(Constructions décrites à la page 61)

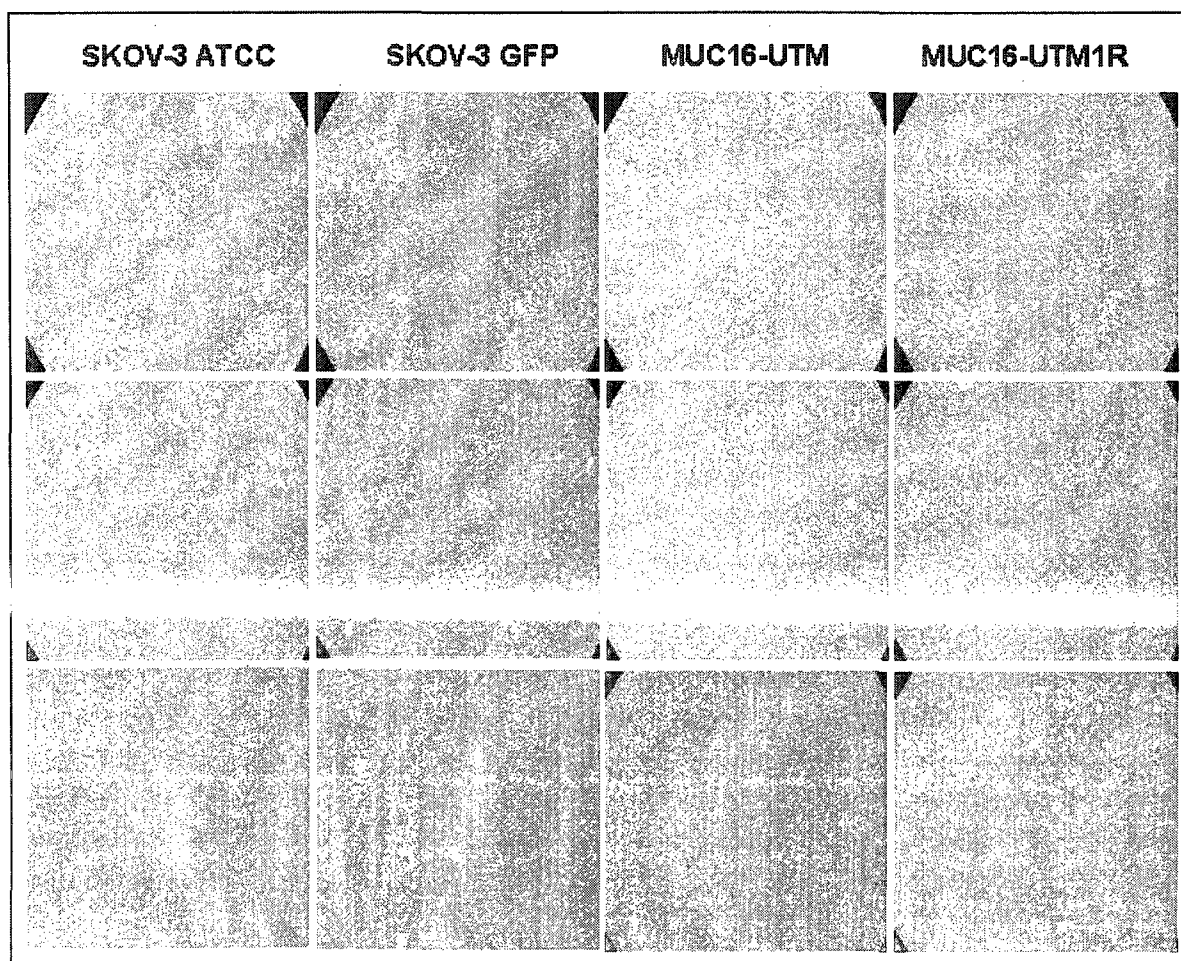
Comme mentionné antérieurement, les cellules SKOV3 (lignée parentale) sont considérées comme étant des cellules ayant un potentiel migratoire modéré. Nous avons voulu déterminer si le gain de fonction (MUC16-UTM et MUC16-1RUTM) pourrait avoir une influence sur ce phénomène impliquant possiblement le domaine extracellulaire de CA125.

La figure 36 montre d'abord qu'au temps 0, toutes les blessures des monocouches des différentes populations sont comparables. Après 6 heures d'incubation, on peut voir que

quelques cellules contrôles (SKOV3 ATCC et SKOV3-GFP) ainsi que les populations stables MUC16-UTM et MUC16-UTM1R se sont déplacées un peu, se sont séparées des cellules des quatre quadrants de façon aussi comparable. Après 24 heures d'incubation, on observe que les cellules contrôlent et les populations MUC16-UTM et MUC16-1RUTM ont presque complètement rempli la blessure en migrant vers le centre de la blessure.

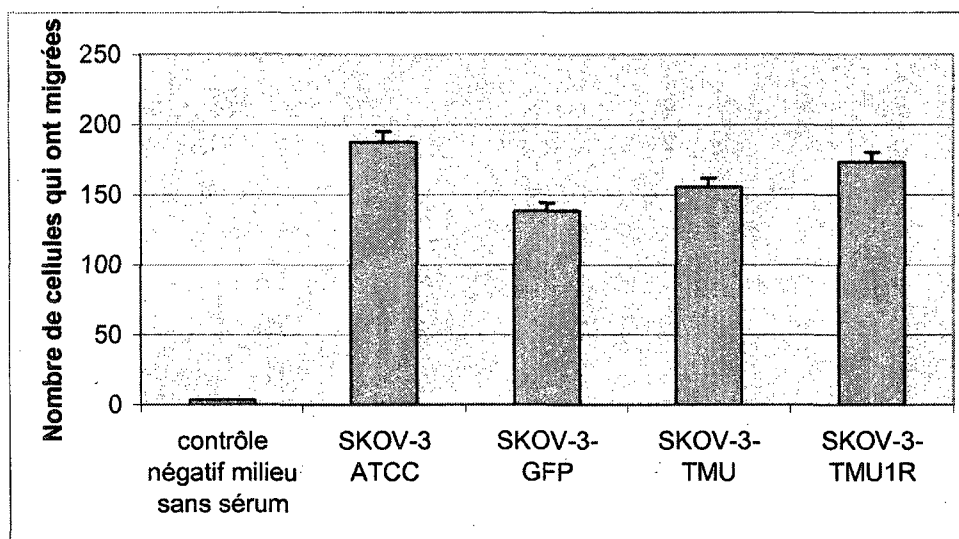
**Figure 44 : Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Les cellules ont étéensemencées de manière à obtenir une monocouche à 100% de confluence. À l'aide d'un embout de 10  $\mu$ L, une marque cruciforme a été générée. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu contenant de l'hydroxyurée. Des photos de la blessure montrant la migration des cellules ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0, 6h et 24 h suite à la blessure.



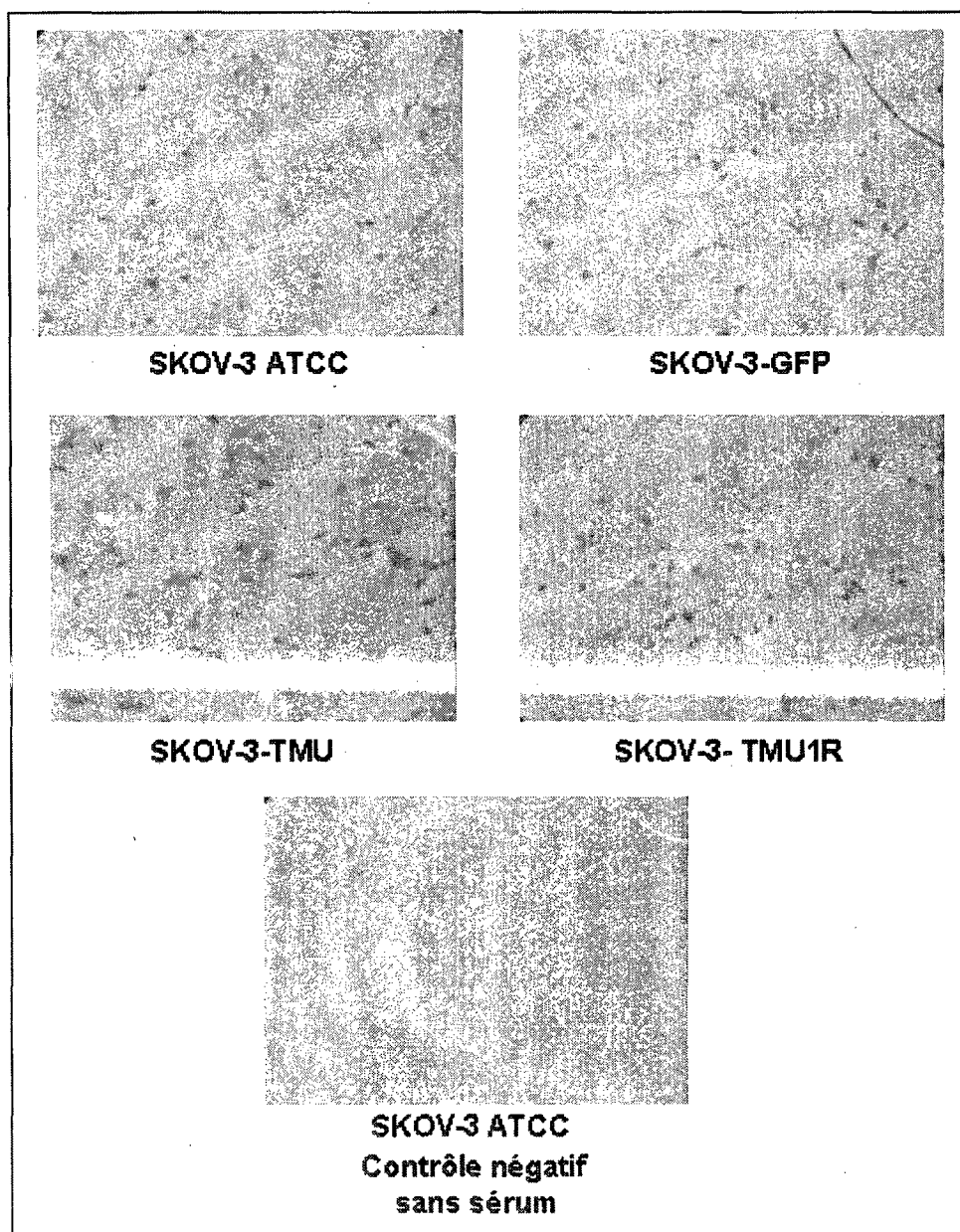
L'essai de chambres de Boyden nous a permis de définir de manière quantitative les cellules ayant traversées les membranes poreuses vers l'agent chimioattractant qui se trouvait en-dessous de cette membrane. Dans cette expérience nous avons aussi créé un contrôle négatif : du milieu sans sérum a été ajouté sous une des membranes. De cette façon les cellules ne possèdent pas le chimioattractant nécessaire qui favoriserait la migration des cellules. Comme attendu, aucune cellule du contrôle négatif n'a été capable de traverser la membrane. Un nombre équivalent de cellules a été compté dans les quatre autres différentes membranes (Figure 37) et les photos de celles-ci ne signalent pas, globalement, des distinctions entre les contrôles SKOV-3 ATTC et GFP et les populations MUC16-UTM et MUC16-1RUTM (Figure 38). Les deux dernières expériences nous permettent d'affirmer que le potentiel migratoire de la lignée cellulaire SKOV3 ne semble donc pas augmenter lorsqu'on exprime de façon exogène à la surface cellulaire les domaines unique et unique + 1 répétition de CA125.

**Figure 45 : Dénombrement des cellules du modèle gain fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125 dans un essai de migration par chambres de Boyden**



**Figure 46 : Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden chez les cellules exprimant domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Dans chacune des chambres de Boyden, 15000 cellules ont étéensemencées et incubées à 37°C pendant 24 heures. Les cellules ont été fixées au méthanol et colorées avec du cristal violet 1%. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500. Le contrôle négatif ne contient pas de chimioattractant.



## **24. Analyse des protéines des jonctions cellulaires et du cytosquelette du modèle gain de fonction (expression des domaines extracellulaires de CA125)**

À fin d'analyser l'impact des différents domaines extracellulaires de CA125 sur les interactions cellule-cellule, nous avons utilisé les populations stables exprimant de différentes parties du domaine extracellulaire de CA125 (domaines unique et unique + 1 répétition) (Constructions décrites à la page 61). Nous avons analysé les variations possibles sur le potentiel métastatique des cellules cancéreuses en considérant les modifications sur les molécules d'adhésion cellulaire, la fonctionnalité de complexes de jonction et les changements au niveau de cytosquelette.

### **24.1 Détermination des modifications des marqueurs épithéliaux chez les cellules du modèle gain de fonction**

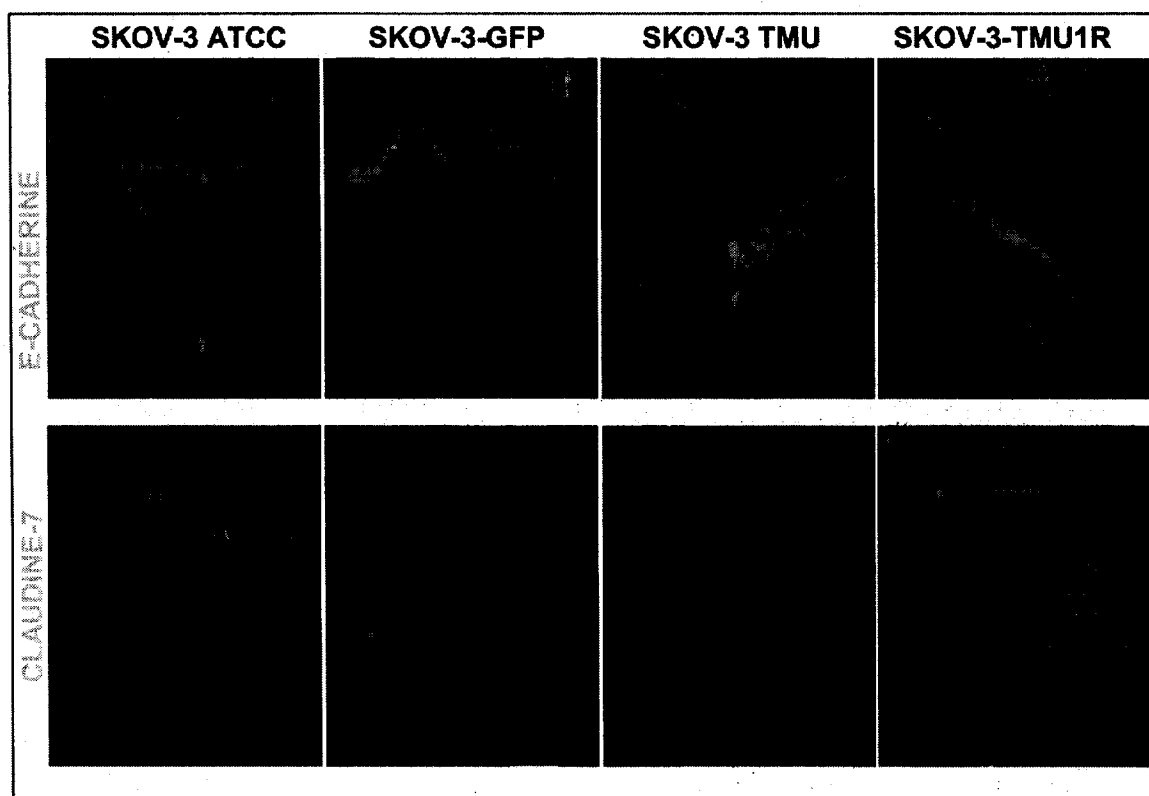
Étant donné que les cellules SKOV-3 sont des cellules avec des caractéristiques mésenchymateuses et épithéliales, et qu'elles n'expriment pas CA125 à la membrane cellulaire, nous avons voulu évaluer si le fait d'exprimer les domaines unique et unique + 1 répétition de CA125 était suffisant pour conférer aux cellules une modification de l'expression de la E-cadhérine et la claudine-7. Des immunofluorescences et des immunobuvardages de type Western ont été effectués. Aucune différence dans l'expression de la E-cadhérine et de la claudine-7 n'a été observée entre les cellules SKOV-3 et les différentes populations stables que ce soit par IF ou par immunobuvardage de type Western (Figures 39 et 40). Ces résultats suggèrent que l'expression forcée des domaines unique et



unique +1 répétition de CA125 aux cellules SKOV-3 n'est pas suffisante pour modifier l'expression de ces marqueurs cellulaires.

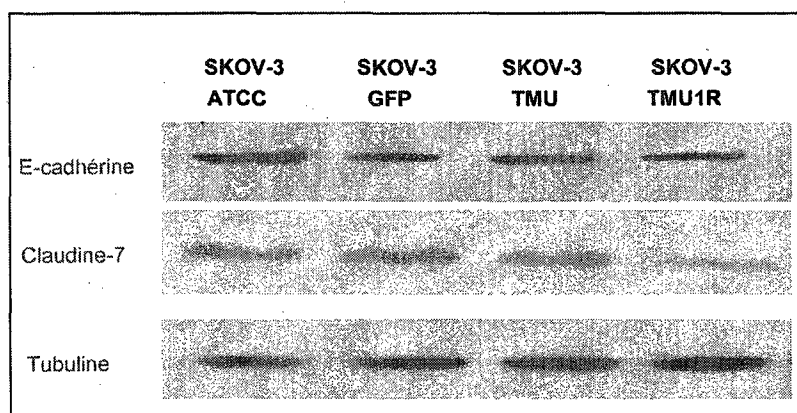
**Figure 47 : Immunofluorescence de l'E-cadhérine et la claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-E-cadhérine (rouge), anti-claudine-7 (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



**Figure 48 : Immunobuvardage de type Western de l'E-cadhérine et la claudine-7 chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Sur un gel 7,5% ou 15% d'acrylamide, 15 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-tubuline servant de contrôle de la quantité de protéines chargées.



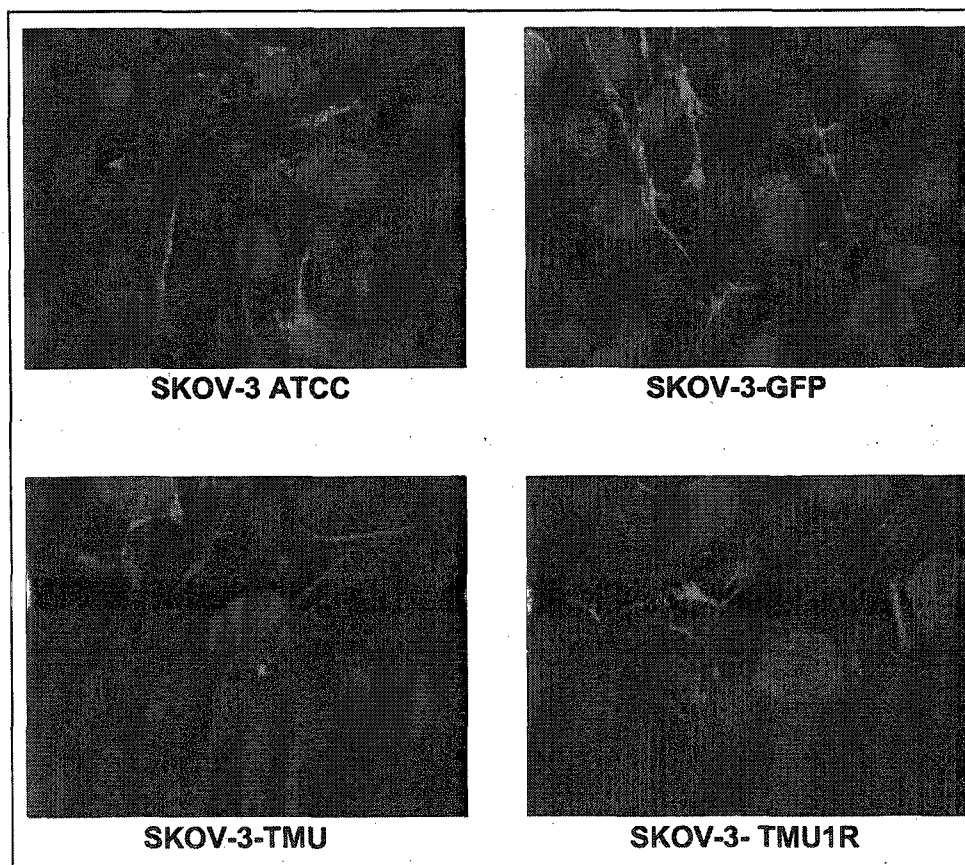
## 24.2 Statut de la F-actine du cytosquelette chez le modèle gain de fonction

La concentration et le patron d'expression de la protéine F-actine a été évalué par IF chez les différentes populations. Aucune différence de concentration de la protéine n'a été observée entre les différentes populations. Le patron d'expression semble être organisé, avec une disposition sous la membrane. On trouve aussi quelques fibres de stress ainsi que la formation de filopodes. Il est possible d'observer certains points focaux d'adhérence. Nous avons remarqué que ce patron d'expression de la protéine ne variait presque pas d'une population à l'autre (Figure 49). Ces données démontrent que l'expression de ces domaines

extracellulaires de CA125 ne causent pas d'arrangement particuliers du cytosquelette chez les cellules SKOV-3.

**Figure 49 : Immunofluorescence de la F-actine chez les populations du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Les cellules ont étéensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-F-actine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.

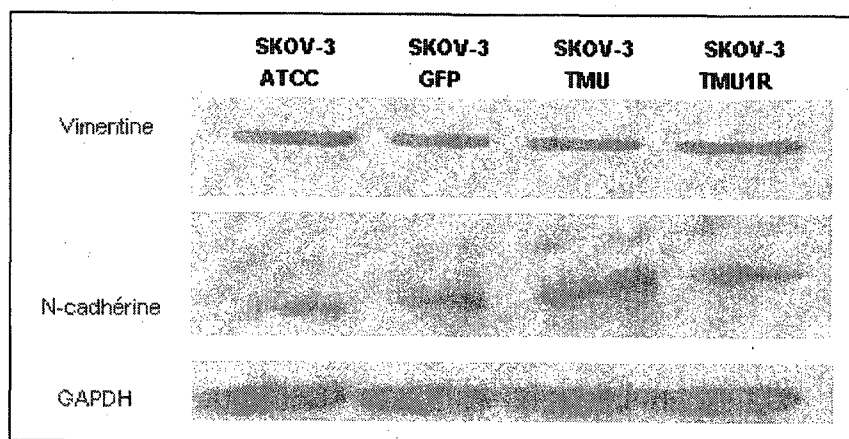


## **25. Analyse de la vimentine et la N-cadhérine chez les populations du modèle gain de fonction**

De la même façon que nous avons examiné ces marqueurs mésenchymateux chez les autres modèles d'étude, nous les avons analysés chez les populations qui expriment les domaines unique et unique + 1 répétition de CA125. Le patron d'expression de la vimentine et la N-cadhérine a été évalué chez les différentes populations. Les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western et par immunofluorescence indiquent qu'il ne semble pas y avoir de différence des niveaux d'expression de vimentine ni de la N-cadhérine d'une population de cellules à l'autre (Figures 50 et 51). Tous ces résultats ensemble nous amènent à penser que l'expression forcée des domaines unique et unique +1 répétition de CA125 chez les cellules du cancer ovarien SKOV-3 (cellules CA125 négatives) n'entraînent pas de modification des caractéristiques mésenchymateuses de ces cellules. . Il semble que ces domaines ne soient pas suffisants; dans ce contexte cellulaire, pour produire les changements nécessaires donnant un phénotype épithélial, caractéristique retrouvé chez les cellules CA125 positives comme les cellules NIH :OVCAR-3.

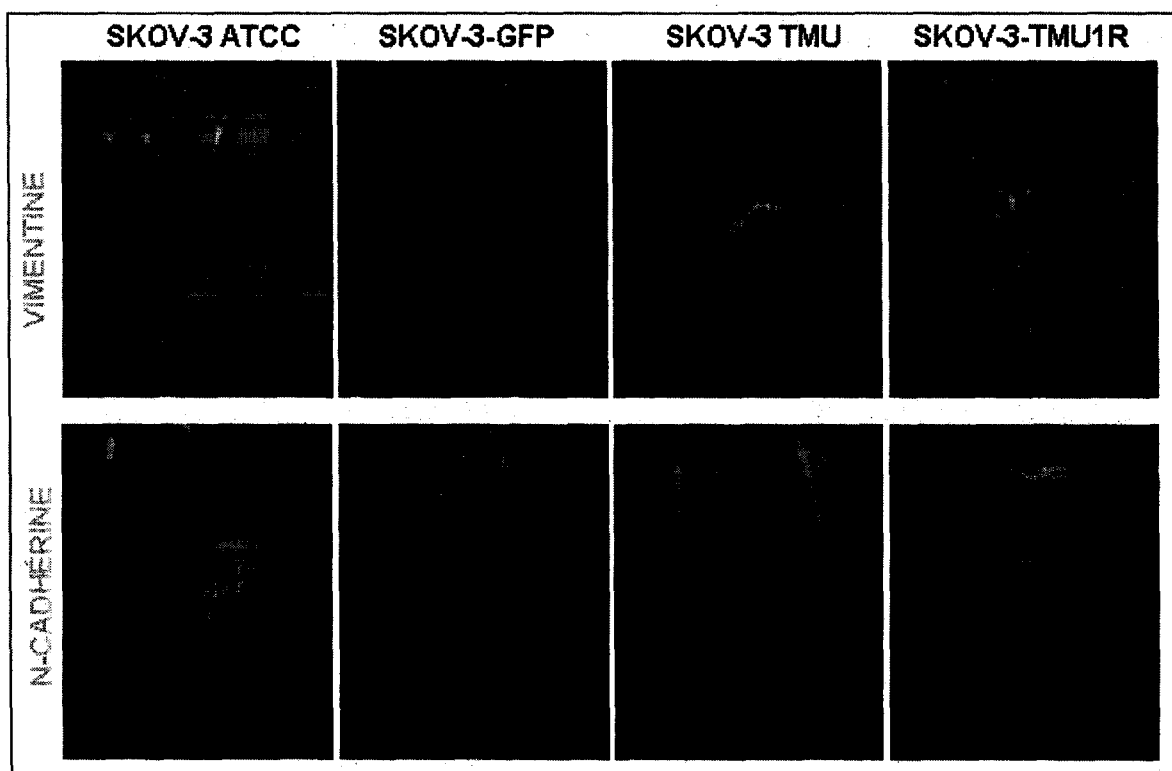
**Figure 50 : Immunobuvardage de type Western pour la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Sur un gel 12% ou 7,5% d'acrylamide, 15 µg de protéines des différents échantillons ont été chargés. La membrane a été aussi révélée avec l'anticorps anti-GAPDH servant de contrôle de la quantité de protéines chargées.



**Figure 51 : Immunofluorescence de la vimentine et la N-cadhérine chez les cellules du modèle gain de fonction exprimant les domaines TMU et TMU+1R de CA125**

Les cellules ont été ensemencées sur des lames et fixées au formaldéhyde 3,7%. Elles ont été perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-vimentine (rouge), anti-N-cadhérine (rouge) et avec du DAPI (bleu) pour les noyaux. Grossissement 100X.



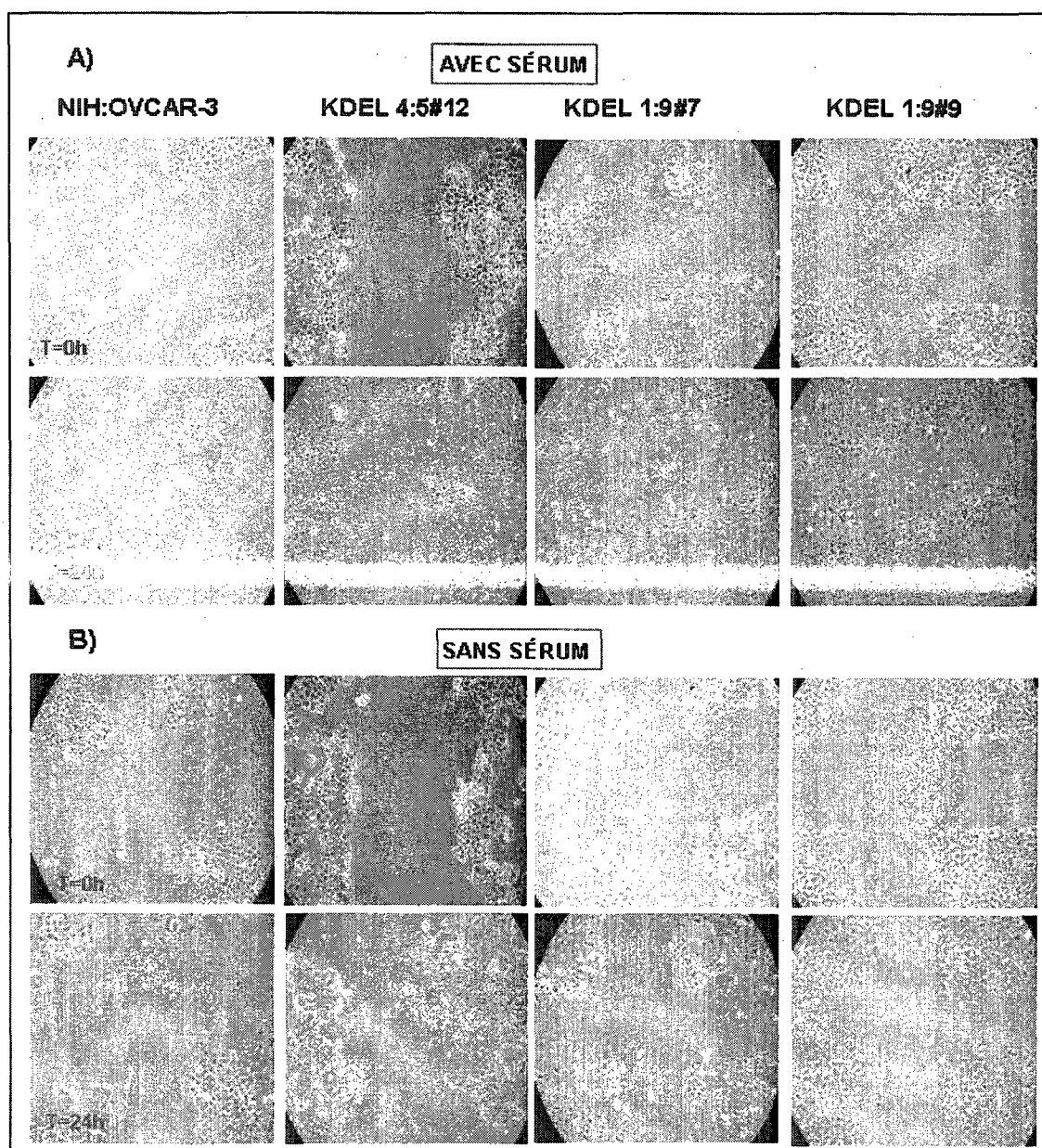
**26. Évaluation des capacités migratoires du modèle perte de fonction (CA125 knockdown)**

Un certain nombre de facteurs chimiotactiques sont responsables de la migration des cellules. Plusieurs études nous montrent l'induction du programme d'EMT suite à la stimulation des divers facteurs de croissance. Parmi tous ces facteurs, nous avons évalué ceux qui ont un

effet ou une importance sur les cellules épithéliales et plus particulièrement ceux qui contribuent au processus d'EMT chez les cellules de la surface épithéliale normale de l'ovaire. Comme nous avons observé précédemment, nos clones OVCAR-3 KDEL 1 :9 #7 et #9 CA125 knockdown montrent un potentiel migratoire augmenté par rapport à la lignée parentale OVCAR-3 et le clone contrôle ScFv OVCAR-3 KDEL 4 :5#12 (Figure 52A). Quand nous avons effectué la même expérience, mais cette fois-ci en absence sérum, nous avons constaté une suppression complète de la migration cellulaire. Ce groupe de figures ne présente pas de différence; les cellules ont été incapables de migrer même après 24 heures de culture. (Figure 52B). Suite à ces résultats, nous avons postulé notre dernier objectif qui était de déterminer quels facteurs de croissance présents dans le sérum du milieu de culture étaient principalement impliqués dans l'induction de la migration de nos clones CA125 knockdown.

**Figure 52 : Essai de migration par blessure de la monocouche cellulaire chez le modèle perte de fonction (CA125 knockdown).**

Les cellules ont étéensemencées de manière à obtenir une monocouche à 100% de confluence. À l'aide d'un embout de 10  $\mu\text{L}$ , une marque cruciforme a été générée. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu contenant de l'hydroxyurée. En A) milieu complet avec sérum, en B) milieu sans sérum. Des photos de la blessure montrant la migration des cellules ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0 et 24 h suite à la blessure.



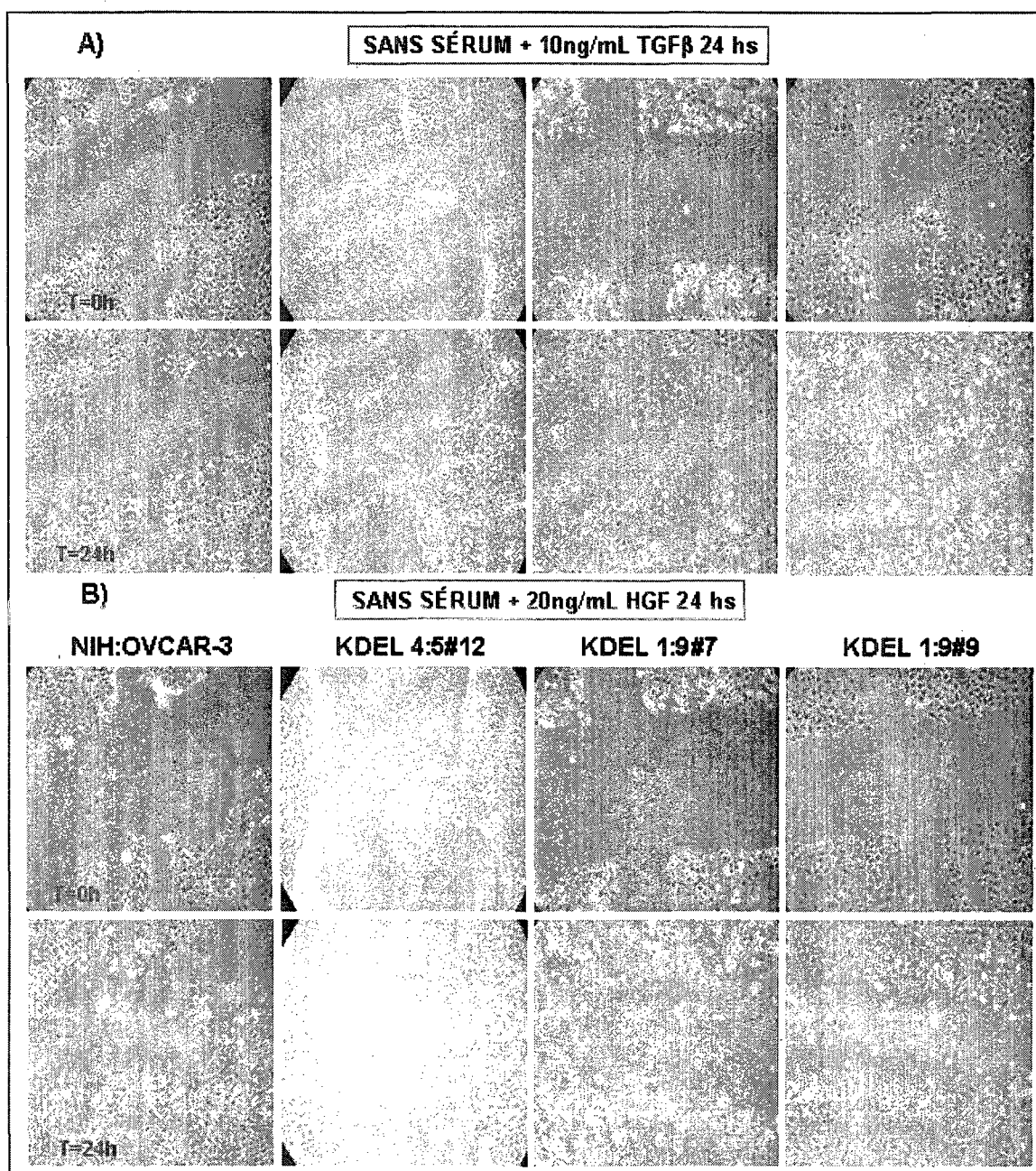


## **27. Effets des facteurs de croissance sur la migration des cellules de cancer de l'ovaire CA125 knockdown**

Les cellules du modèle perte de fonction ont été incubées dans du milieu sans sérum, avec l'hydroxyurée comme agent d'inhibition de la prolifération et exposées à divers facteurs de croissance (TGF $\beta$ , HGF et EGF). La migration cellulaire a été mesurée à l'aide d'un essai par blessure de la monocouche cellulaire. Aux figures 53A et 53B, les cellules ont été mises en culture avec du milieu sans sérum mais auquel nous avons ajouté 10 ng/mL de TGF $\beta$  ou 20 ng/mL d'HGF, respectivement. Dans les deux conditions, la blessure de la monocouche n'a pas été réparée et on observe à peine quelques cellules des clones CA125 knockdown ayant migré vers le centre de la blessure. Ces images suggèrent que ni le TGF $\beta$  ni l'HGF ne stimulent de façon significative la migration des clones CA125 knockdown.

**Figure 53: Essai de blessure de la monocouche pour évaluer les effets des facteurs de croissance sur la migration cellulaire chez le modèle gain de fonction**

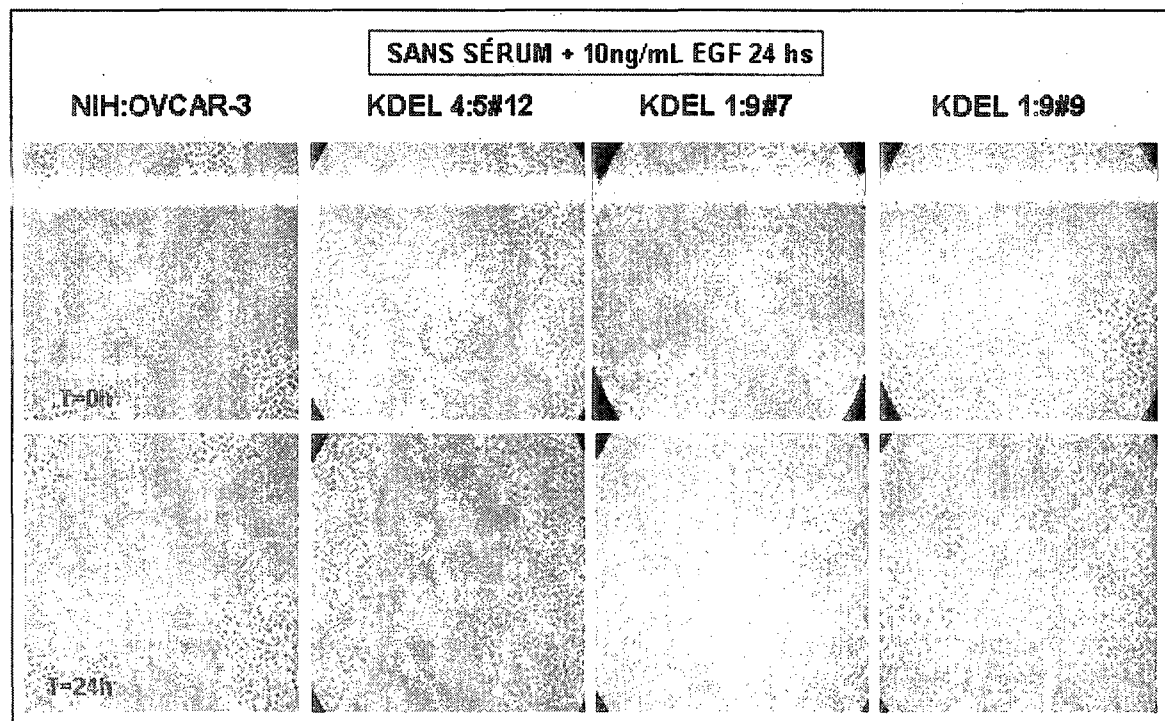
Une marque cruciforme a été générée sur une monocouche cellulaire. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu sans sérum contenant de l'hydroxyurée, auquel nous avons ajouté 10ng/mL de TGF $\beta$  (A) ou 20ng/mL d'HGF (B). Des photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0 et 24 h suite à la blessure.



Par contre, les photos de l'expérience suivante dans laquelle les cellules ont été exposées à 10 ng/mL d'EGF, nous révèlent que les cellules des clones CA125 knockdown se séparent des bords de la croix et bougent en remplissant presque totalement la blessure. Cette condition n'affecte pas la lignée parentale OVCAR-3 ni le clone contrôle ScFv KDEL 4 :5 #12 (Figure 54). Ces résultats suggèrent que l'induction de la migration des cellules CA125 knockdown est dépendante de la présence d'EGF dans le milieu de culture.

**Figure 54: Essai de blessure de la monocouche pour évaluer les effets d'EGF sur la migration cellulaire chez le modèle gain de fonction**

Une marque cruciforme a été générée sur une monocouche cellulaire. Les cellules ont été incubées 24 heures dans du milieu sans sérum contenant de l'hydroxyurée, auquel nous avons ajouté 10ng/mL d'EGF. Des photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0 et 24 h suite à la blessure.

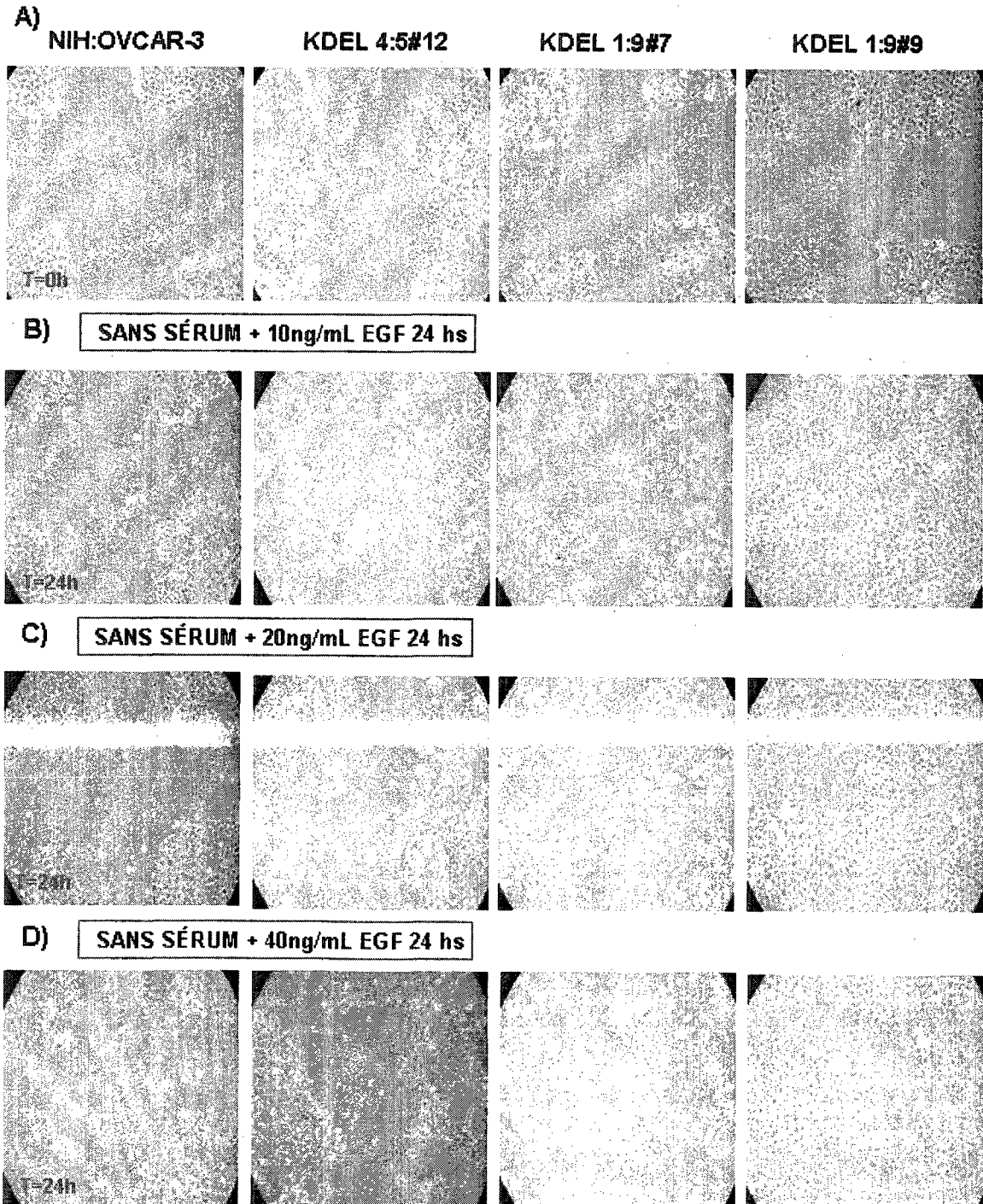


## **28. EGF provoque la migration des cellules CA125 knockdown d'une manière indépendante de la dose**

Après avoir observé une augmentation de la migration cellulaire chez les clones CA125 knockdown due à la présence exclusive d'EGF dans le sérum, nous avons voulu évaluer si cette augmentation était dépendante de la concentration d'EGF dans le milieu de culture. Dans l'essai de la figure 55, nous remarquons en A) où  $T = 0h$ , que la blessure était comparable entre la lignée parentale, le clone contrôle ScFv et les clones CA125 knockdown. Après 24 heures d'incubation dans du milieu sans sérum auquel nous avons ajouté des concentrations de 10, 20 et 40 ng/mL d'EGF, nous remarquons que la motilité des clones KDEL 1 :9#7 et #9 ne varie pas avec l'augmentation de la concentration d'EGF (Figures 55B, 55C et 55D). Ces résultats suggèrent qu'avec une dose de 10 ng/mL d'EGF la stimulation de la migration était maximale. Des doses plus faibles que 10ng/mL n'ont pas été étudiées.

**Figure 55 : Essai de blessure de la monocouche cellulaire pour évaluer la migration des clones CA125 knockdown selon la concentration d'EGF**

Des photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500 aux temps 0 et 24 h suite à la blessure.



## **29. Des inhibiteurs d'EGFR bloquent la migration cellulaire induite par EGF chez les clones CA125 knockdown**

Afin de poursuivre l'analyse de l'importance d'EGF et de corroborer que la migration observée est principalement due à ce facteur de croissance, nous avons effectué un autre essai de blessure de la monocouche. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec deux différents inhibiteurs puissants et sélectives d'EGFR (PD 153035 et AG 1478). Le lendemain, après avoir effectué la blessure, les cellules ont été incubées dans du milieu complet avec sérum ou sans sérum + 10ng/mL d'EGF.

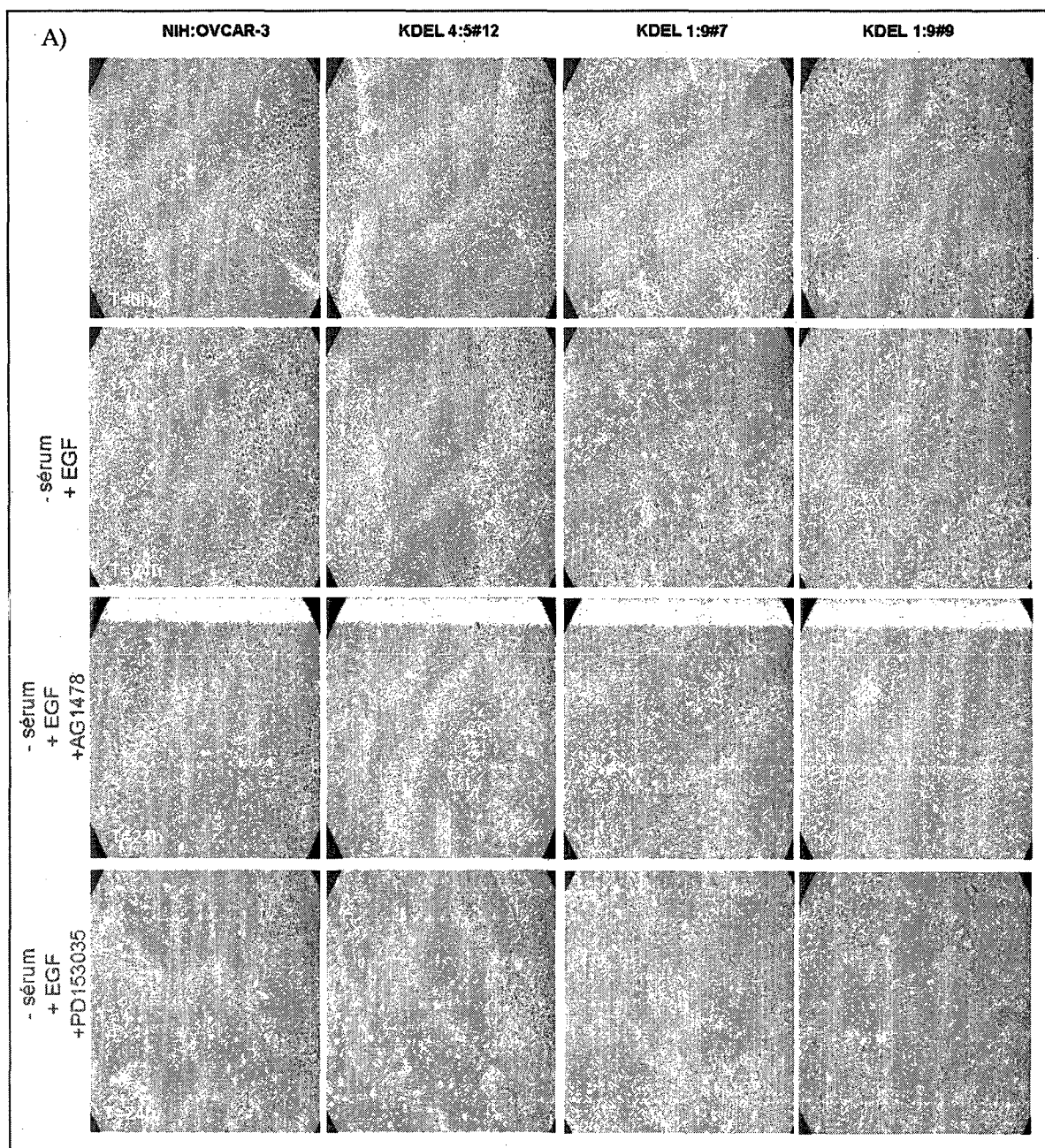
La figure 46A montre, comme observé précédemment, la capacité de migration des clones CA125 knockdown induite par la présence unique d'EGF comme agent stimulant dans le milieu de culture. Ces photos nous permettent de démontrer que la migration cellulaire des clones CA125 knockdown induite par EGF, est inhibée d'une façon très marquée, quand nous traitons les cellules avec les inhibiteurs d'EGFR PD 153035 et AG 1478. Les photos suivantes (46B) montrent, comme attendu, que seulement les cellules CA125 knockdown sont capables de remplir la croix quand elles sont cultivées dans du milieu complet (avec sérum). Lorsque nous exposons ces cellules avec les inhibiteurs d'EGFR (5 $\mu$ M de PD 153035 ou 5 $\mu$ M d'AG 1478), cette migration cellulaire est abolie d'une façon significative et presque complètement. Toutefois, nous constatons que, possiblement dû à d'autres facteurs présents dans le milieu de culture, une minime quantité de cellules a été capable de bouger et d'effacer légèrement la ligne droite de la blessure effectuée. Cette observation nous permet constater que l'effet stimulateur du sérum sur le potentiel migratoire des clones CA125

knockdown est principalement dû à la présence d'EGF et qu'au moins un autre facteur présent dans le sérum peut aussi stimuler la migration cellulaire mais de façon minimale.

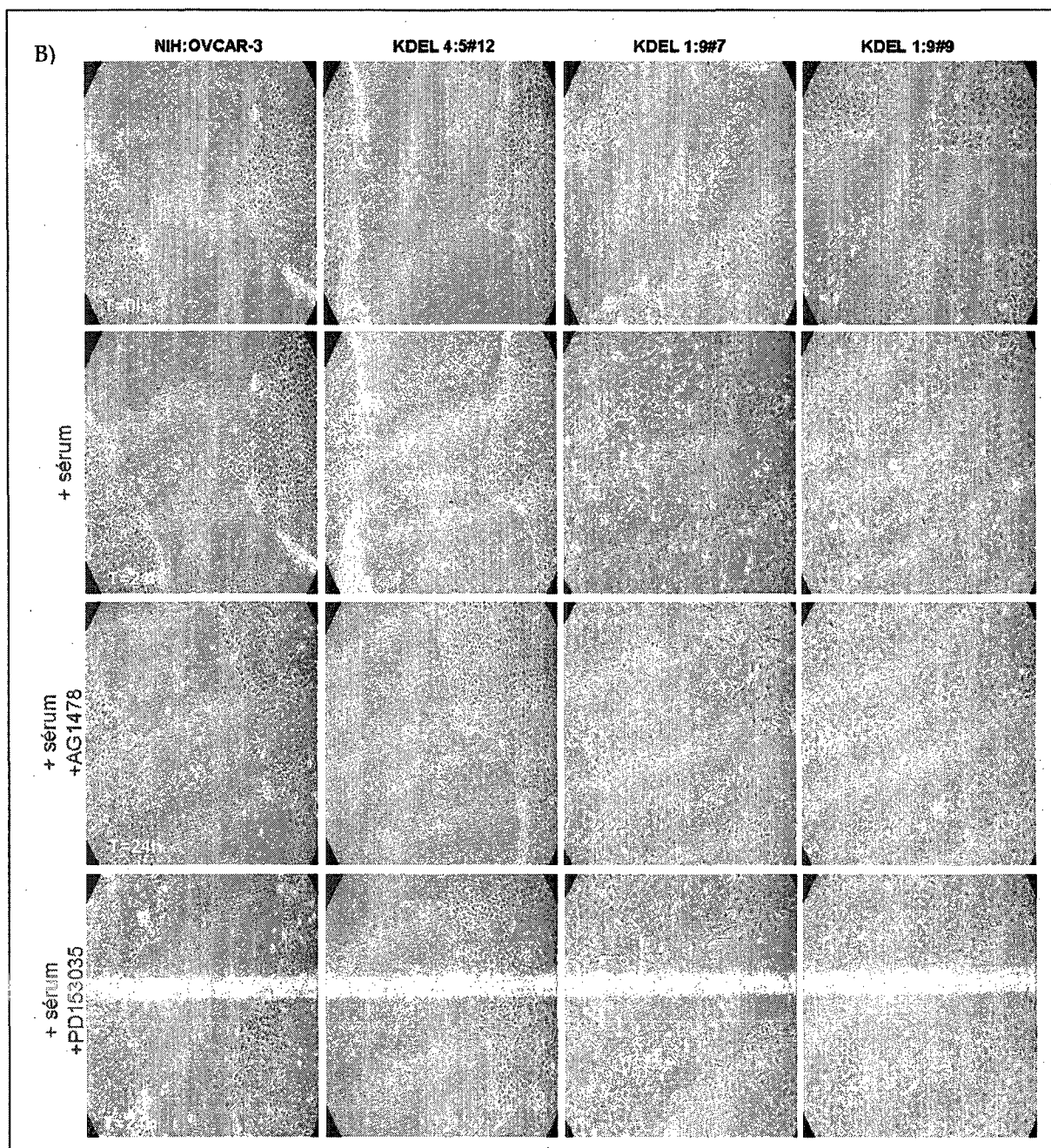


**Figure 56 : Des inhibiteurs d'EGFR bloquent la migration cellulaire induite par EGF chez les clones CA125 knockdown**

Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec deux différents inhibiteurs d'EGFR (PD 153035 et AG 1478). Le lendemain, après avoir effectué la blessure, les cellules ont été incubées dans du milieu complet avec sérum (A) ou sans sérum + 10ng/mL d'EGF (B). Les photos ont été prises avec un microscope à contraste de phase et un appareil photo numérique Nikon Coopix 4500, aux temps 0 et 24 heures suite à la blessure.







## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le cancer épithélial de l'ovaire représente 95% de tous les cas diagnostiqués du cancer de l'ovaire. Ce cancer affecte la vie des milliers de femmes et leurs familles à chaque année. Le cancer épithélial de l'ovaire prend le cinquième rang en incidence parmi tous les cancers chez les femmes et il reste le cancer gynécologique le plus létal. En 2008, on estime que 2500 Canadiennes ont appris qu'elles sont atteintes d'un cancer de l'ovaire et que 1 700 mourront de suite de la maladie (Canadian Cancer Statistics, 2008). Les patientes avec un cancer épithélial de l'ovaire sont souvent asymptomatiques ou manifestent des symptômes vagues et non spécifiques; en conséquence le diagnostic dans un stade tardif est la norme. Il présente un taux de mortalité très élevé : 70-75% des femmes sont diagnostiquées à un stade III ou IV de la maladie avec une survie à 5 ans de seulement 15% à 31%. En comparaison, le taux de survie après 5 ans des patientes en stade I est significativement mieux, il peut varier entre 90 % et 95% (JEMAL et al, 2006).

La surface épithéliale de l'ovaire (OSE) est une couche simple de cellules organisées latéralement par des complexes de jonctions : jonctions serrées, adhérentes et desmosomes. Elle a une importance majeure dans les pathologies gynécologiques : elle est considérée comme la source de 90% de néoplasies ovariennes. Les kystes d'inclusion épithéliaux dérivés d'OSE sont les sites préférentiels considérés comme étant l'origine du cancer épithélial de l'ovaire (AUERSPERG et al, 1998 et MURDOCH, 1996). Cette couche simple de cellules épithéliales contribue à l'ovulation par lyse et reconstruction du cortex ovarien. Dans la plupart des épithéliums, l'acquisition d'une fonction motile est liée à des

changements de la physiologie cellulaire. Les cellules avec un potentiel de migration perdent l'expression de ses caractéristiques épithéliales et acquièrent des propriétés mésenchymateuses. Des changements importants comme la transition épithélium mésenchymateuse (EMT) ont été déjà observé. L'EMT est un processus fondamental pendant l'embryogenèse, la réparation des tissus, la progression tumorale et la physiologie du tractus reproducteur (HAY et ZUK, 1995, TANAKA et al, 2004, RODIER et al, 1995 et DEMIR et al, 2004). Les principales caractéristiques cellulaires d'EMT sont la perte de la morphologie polygonale des cellules épithéliales, la polarité apicobasale et les interactions cellulaires, avec le développement d'une forme semblables aux fibroblastes, réorganisation des filaments du cytosquelette, une augmentation de la motilité cellulaire et l'induction de protéases pour la dégradation de la matrice extracellulaire (RADISKY, 2005).

La dualité EMT est bien expérimentée par les OSE et la perte de cette dualité forme la base de l'hypothèse sur l'étiologie du cancer épithélial de l'ovaire : en période post-ovulatoire, les cellules épithéliales retenues dans le stroma ovarien ne peuvent pas être recyclée en cellules mésenchymateuses pour maintenir l'homéostasie du tissu ovarien, elles forment des agrégats cellulaires et des kystes d'inclusion où les cellules souffriront une métaplasie et transformation maligne AUERSPERG et al, 2001) (Figure 13). Nos résultats démontrent que l'antigène CA125 semble avoir une influence sur le processus d'EMT des cellules de cancer de l'ovaire en culture, et de la même façon qui a été observé chez les OSE, l'EGF est un facteur stimulateur important qui régule plusieurs des événements menant à l'EMT de ces cellules.

L'antigène tumoral CA125 a été initialement identifié par l'anticorps monoclonal OC125 dans des lignées cellulaires de carcinome ovarien humain (BAST et al, 1981). Les niveaux sériques de CA125 sont utilisés pour le suivi de la réponse à la chimiothérapie, de la rechute et de la progression de la maladie des patientes atteintes du carcinome ovarien. Des études en cours évaluent l'utilité de CA125 en conjonction avec des autres marqueurs sériques pour la détection précoce de ce cancer (RUSTING et al, 2004 et JACOBS et al, 1990). CA125 est une grande glycoprotéine transmembranaire avec trois domaines. Le premier domaine est le domaine carboxy-terminal qui inclut une courte queue cytoplasmique avec un site de phosphorylation et le domaine transmembranaire. Le deuxième domaine est localisé à l'extérieur de la cellule et contient plus de 22,000 acides amines. Un site de clivage pour le domaine extracellulaire de CA125 est localisé adjacent à la membrane. Une grande portion du domaine extracellulaire comprend plus de 60 répétitions en tandem avec 156 acides amines chaque un. Le troisième domaine de la molécule de CA125 est le domaine amino-terminal qui est attaché aux séquences de répétitions. Il est fortement glycosylé lors des modifications post traductionnelles (O'BRIEN et al, 2001 et YIN et LLOYD, 2001). Malgré plus de 25 ans de recherche fondamentale et clinique, les complexes fonctions biologiques de CA125 sont pauvrement comprises. Divers fonctions de CA125 ont été suggérées et fondées sur la séquence peptidique décrite, la structure proposée et des études in vitro. Par exemple, CA125 semble jouer un rôle important dans l'adhésion cellulaire, l'invasion et la métastase intrapéritonéale. Cette fonction est supportée par l'observation que CA125 peut lier la mésothéline, une protéine fortement exprimée dans les surfaces péritonéales par les cellules mésothéliales. En se liant à la mésothéline, la protéine CA125 peut augmenter le potentiel d'invasion des cellules de carcinome ovarien in vitro (GUBBELS et al, 2006). La présence

de CA125 dans les membranes embryogéniques suggère un rôle comme lubrifiant, une fonction caractéristique des protéines hautement glycosylées. D'autres études ont démontré que CA125 intervient dans la suppression immune, par exemple en inhibant la réponse des cellules "natural killer" in vitro (PATANKAR et al, 2005).

Parmi plusieurs types cancéreux comme le cancer du pancréas et le cancer du sein, certaines mucines semblent avoir une implication dans la progression tumorale. Des études sur les mucines MUC1 et MUC4 dans différents modèles ont montré que la présence de MUC1 ou MUC4 pouvait augmenter l'agressivité des tumeurs (KOHLGRAF et al, 2003 et SINGH et al, 2004). La diminution de MUC4 par un antisens diminue les capacités migratoires de même que le potentiel métastatique des cellules cancéreuses du cancer du pancréas. L'expression ectopique de MUC1 dans des cellules peu agressives augmente le caractère agressif des cellules car on observe une augmentation des masses dans des sites distantes. Étant donné que CA125 est une mucine et qu'elle possède une structure assez semblable à MUC1 et MUC4 nous nous sommes intéressé à évaluer son implication dans les interactions cellule-cellule et le processus métastatique impliquées dans le processus d'EMT des cellules de cancer de l'ovaire

Comme pour la plupart des mucines, l'étude des fonctions de CA125 s'est avérée difficile en raison de la forte taille de cette protéine. Il était donc essentiel de développer des outils d'études de CA125 de manière à contourner ce problème. Les clones stables CA125 knockdown dérivés de la lignée NIH : OVCAR-3 produits dans le laboratoire et exprimant un scFv contre CA125 constituent une des solutions à cette difficulté et permettent de faire

l'étude des rôles de CA125 par la perte de fonction de cette protéine. La génération de constructions d'ADN permettant l'expression de certains domaines de CA125 seulement, diminuant ainsi de beaucoup la taille de la protéine, offre aussi la possibilité d'associer des fonctions à ces domaines en particulier.

### **30. L'antigène tumoral CA125 influence le processus d'EMT des cellules de cancer de l'ovaire**

Les cellules de la lignée parentale NIH : OVCAR-3, utilisées dans plusieurs expériences de notre projet, sont des cellules obtenues à partir de d'une patiente avec un adénocarcinome progressive de l'ovaire. Elles sont de cellules cancéreuses, très bien différenciées et avec un bas potentiel de malignité. Elles sont des cellules d'aspect épithélial, petites, hexagonales et cuboïdes. En culture, elles croissent en plaque, peuvent s'entasser et ont la capacité de former des sphéroïdes en suspension. Les marqueurs de type épithélial (E-cadhérine, claudine, cytokératines 8 et 18) sont bien exprimés et d'une façon constante. Ces cellules possèdent aussi une organisation harmonieuse du cytosquelette d'actine et elles ne migrent pas. Les cellules OVCAR-3 expriment fortement CA125 à la surface membranaire.

En reprenant quelques expériences avec le modèle perte de fonction de CA125 réalisées antérieurement dans notre laboratoire, nous savons que lorsque nous effectuons le knockdown de CA125 de la membrane cellulaire des cellules OVCAR-3, les cellules acquièrent une morphologie très semblable aux fibroblastes, une incapacité de former des

agrégats cellulaires ou sphéroïdes et une augmentation de l'expression des protéines (CD44 et proMMP2) impliquées dans le processus de métastases cellulaire (PINARD, 2005).

Par la suite, nous avons voulu étudier la relation de CA125 avec le processus d'EMT des cellules de cancer de l'ovaire. Plusieurs changements cellulaires sont associés avec l'EMT et cette transition est toujours caractérisée avec une dispersion cellulaire. La dispersion cellulaire consiste principalement en deux événements biologiques qui apparaissent simultanément ou en synchronie dans la cellule : la perte des complexes intercellulaires et l'acquisition de motilité cellulaire conduite par l'arrangement du cytosquelette et la formation des nouveaux contacts cellule-substratum (YEH-SHIU et al, 2004). Les deux réponses ont été démontrées par des essais d'immunofluorescence et d'immunobuvardage de type Western sur notre modèle perte de fonction. Ces essais nous permettent d'affirmer que le knockdown de CA125 des cellules OVCAR-3 entraîne une diminution de l'expression et/ou relocalisation des marqueurs épithéliaux : E-cadhérine, claudine-7 et cytokératines 8 et 18 chez les clones OVCAR-3 #7 et #9 (CA125 knockdown) par rapport aux cellules de la lignée parentale et du contrôle scFv. Nous avons confirmé par microscopie électronique que la lignée cellulaire OVCAR-3 qui montrait plusieurs complexes des jonctions intercellulaires, surtout des jonctions de type adhérentes et de desmosomes avec un espace intercellulaire étroit et fermé, perdait beaucoup de ces complexes de jonctions et l'espace entre deux cellules était augmenté et plus large lorsque nous abolissons l'expression de CA125 à la surface de ces cellules. Nous avons aussi observé que la vimentine et la N-cadhérine, deux marqueurs mésenchymateux typiques et complètement absentes chez les cellules OVCAR-3 CA125 positives se sont considérablement manifestés chez les clones #7 et #9 CA125

knockdown. Nous avons constaté un réarrangement de la F-actine avec des changements d'un patron linéaire, avec de l'actine corticale observée chez les cellules CA125 positives à un patron plus diffus et discontinu avec la formation des fibres de stress chez les clones CA125 knockdown. Ces fibres de stress pourraient donner aux clones le potentiel de migration. Finalement, les essais de migration par blessure de la monocouche et à l'aide des Chambres de Boyden nous ont permis confirmer que les clones CA125 knockdown #7 et #9 ont gagné un potentiel de migration important lorsque nous les comparons à la lignée parentale OVCAR-3 et au contrôle scFv #12. Tous ces résultats mettent en évidence que l'abolition de la mucine CA125 est impliquée dans le processus tumoral des cellules de cancer de l'ovaire, plus particulièrement dans le contrôle de l'EMT en agissant comme un possible régulateur négatif de ce processus. Ces données nous suggèrent que les cellules OVCAR-3 CA125 positives qui sont des cellules d'aspect et comportement épithélial sont capables de subir divers changements et poursuivre une EMT suite à l'abolition de CA125 à la surface cellulaire.

### **31. EGF stimule la migration des clones CA125 knockdown**

Quand le processus d'EMT n'est pas déclenché par l'activation oncogénique, le principal mode d'induction d'EMT est fourni par des facteurs de croissance spécifiques ou par des composantes de la matrice extracellulaire en se liant à leurs récepteurs respectifs. Les facteurs de croissance sont multifonctionnels et participent à une variété des réponses qui peuvent moduler la croissance cellulaire et la survie, la différenciation et la migration cellulaire. Dans notre étude, nous avons observé que lorsque nous laissons les cellules de



notre modèle perte de fonction en incubation dans du milieu de culture qui ne contient pas de sérum, la migration constatée chez les clones CA125 knockdown ne se produit plus. Cette absence du sérum dans le milieu dénote l'importance d'éléments stimulateurs présents dans le sérum. Par la suite, nous avons voulu déterminer quels facteurs pourraient être considérés comme des effecteurs de l'EMT expérimentée par nos clones CA125 knockdown. Particulièrement, nous nous sommes concentré à évaluer la capacité de migration de ces cellules suite à la stimulation avec certains facteurs de croissance, notamment des facteurs de croissance connus pour moduler le comportement des cellules OSE. La littérature nous montre plusieurs exemples de l'implication de HGF ou  $TGF\beta$  dans le processus d'EMT chez différents tissus cancéreux (LY et al, 1994 et SHIBAMOTO et al, 1992). Suite à nos expériences sur la lignée cellulaire OVCAR-3 de cancer de l'ovaire et sur les clones OVCAR-3 CA125 knockdown nous considérons que la migration cellulaire remarquée chez les clones CA125 knockdown n'est pas due à la stimulation du HGF ni de  $TGF\beta$ . Nous sommes capables de trouver à peine quelques cellules que se sont déplacées, donc, nous considérons qu'ils ne sont pas les principaux facteurs à produire l'effet stimulateur sur la migration de ces cellules. Il est possible que ces cellules restent insensibles à ces facteurs ou bien il est aussi possible que ces facteurs accomplissent un rôle, autre que la migration, dans le processus de la progression tumorale chez les cellules du cancer de l'ovaire.

Comme mentionné auparavant, l'EMT est un mécanisme biologique essentiel pour la physiologie de la surface épithéliale de l'ovaire (OSE) et sa défaillance pourrait contribuer à la progression néoplasique (SALAMANCA et al, 2004 et AUERSPERG et al, 2001). Pour comprendre la physiologie des cellules OSE dans un microenvironnement postovulatoire, il a

été important de déterminer la réponse des ces cellules aux stimuli présents dans l'environnement. L'EGF a été démontré comme étant un inducteur de plusieurs composantes de l'EMT chez les cellules OSE: perte de la cytokératine, dispersion cellulaire, stimulation des différents voies de signalisation, augmentation de la motilité, induction de l'activité des MMP-2/-9. (SALAMANCA et al, 2004 et AHMED et al, 2006). Dans notre étude nous avons aussi observé que l'EGF agit comme le principal facteur régulant la migration des cellules OVCAR-3 CA125 knockdown. Suite à l'incubation de ces cellules dans du milieu sans sérum + EGF nous arrivons à conclure que le maintien de la migration des cellules CA125 knockdown est dépendant de la présence du EGF dans le milieu de culture et que cette migration est presque exclusivement due à l'effet de ce facteur de croissance. L'ajout de différents inhibiteurs du récepteur de EGF (EGFR) montre une abolition quasi complète de la migration cellulaire de clones CA125 knockdown et le nombre de cellules qui se sont déplacées est insignifiant.

### **32. Le domaine CTD de CA125 favorise l'EMT des cellules de cancer de l'ovaire**

Après d'avoir complété nos premiers objectifs d'établir une certaine influence de la protéine CA125 dans la progression tumorale et le processus d'EMT chez nos cellules qui n'expriment pas CA125 à la membrane et d'identifier l'EGF comme principal facteur impliqué dans ces événements, nous avons voulu différencier le rôle des divers domaines structuraux de la protéine CA125. Nous avons utilisé le modèle gain de fonction en transfectant les cellules parentales SKOV-3 (CA125 négatives et qui possèdent un phénotype mixte entre épithéliale et mésenchymateux) avec le domaine CTD de CA125. A notre

surprise, cette population expérimentait beaucoup de changements cellulaires en adoptant un phénotype plus mésenchymateux. Ces cellules perdaient leurs marqueurs de type épithéliaux (E-cadhérine, claudine-7), et par conséquent une diminution des leurs interactions cellule-cellule. De plus, le domaine CTD semblait octroyer une plus forte expression des indicateurs de type mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine). Également, ces populations SKOV-3 CTD acquéraient un plus grand potentiel de déplacement en exhibant une capacité de migration accrue par rapport à la lignée parentale SKOV-3 (CA125 négatives). Nos résultats montrent que la portion CTD de CA125 est indispensable et qu'elle, toute seule, est la responsable des transformations observées chez les SKOV3 CTD. Dans le domaine CTD de CA125, nous retrouvons des sites potentiels de phosphorylation ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire typique (BOIVIN, 2005). Une de nos hypothèses est que le domaine CTD pourrait être activé par la phosphorylation des résidus tyrosines situés dans la queue cytoplasmique. Cette phosphorylation pourrait initialiser une cascade de signalisation intracellulaire menant aux conséquences dans les jonctions cellule-cellule, dans le cytosquelette et finalement au noyau qui produiront un nouveau programme transcriptionnel pour maintenir le phénotype mésenchymateux.

Comme mentionné dans l'introduction, plusieurs études basées sur des données cliniques, ont démontré une corrélation entre les niveaux sanguins de CA125, son expression tissulaire et le pronostic des patientes atteintes de cancer épithélial de l'ovaire. Les patientes en stade précoce de la maladie présentaient des niveaux faibles et stables de CA125 dans le flux sanguin mais une très forte expression de cette molécule dans les tissus ovariens. Ces patientes manifestaient un bon pronostic et une survie d'environ 90% à 5 ans. Dans des

stades plus avancés de la maladie, l'augmentation de la détection de CA125 au niveau sanguin s'accompagnait d'une diminution de son expression tissulaire. Cela dénotait un mauvais pronostic et diminution remarquable de la survie. (HOGDALL et al, 2007; BERCHUCK et al, 1989; SAWIRIS et al, 2002). Ces événements pourraient s'expliquer par le fait que CA125 serait clivé, par des mécanismes qui sont encore inconnus, dans sa partie extracellulaire et juxtamembranaire et le relâchement de cette portion extracellulaire causerait une augmentation de sa concentration sérique. De cette façon, CA125 ne serait plus détectable aux tissus (les épitopes reconnues par les anticorps se trouvent seulement dans les domaines de répétitions extracellulaires). Par contre, son domaine intracellulaire ou sa portion CTD resterait associé encore dans la cellule et elle pourrait être la responsable d'ordonner un comportement plus agressif des cellules. La transition épithélium mésenchymateuse ainsi que la migration représentent deux exemples possibles de ce comportement agressif des tumeurs. Ces deux exemples coïncident clairement avec les résultats obtenus dans le laboratoire avec les populations SKOV-3 CTD, ce qui suggère une possible régulation positive sur le potentiel malin et métastatique des cellules de cancer ovarien coordonnée par le domaine CTD de CA125.

### **33. Les domaines TMU et TMU+1R de CA125 ne modifient pas le comportement des cellules SKOV-3**

Finalement, nous avons voulu investiguer les rôles possibles que certains domaines extracellulaires de CA125 pourraient entraîner. Il a été démontré que via son domaine extracellulaire des répétitions, CA125 favorise l'attachement des cellules cancéreuses aux cellules mésothéliales et lie aussi la surface des cellules NK (GUBBELS et al, 2006 et PATANKAR et al, 2005). Basés sur ces données nous avons attribué à ces domaines une activité présumée dans la régulation de l'adhésion intercellulaire. Nous avons créé un autre modèle gain de fonction où nous avons forcé l'expression de domaines TMU et TMU+1R sur les cellules SKOV-3 CA125 négatives. Avec l'expression de ces domaines nous nous attendions à regagner quelques caractéristiques de cellules épithéliales. Par contre, dans toutes les expériences effectuées nous n'avons pas constaté de différence sur le comportement des cellules SKOV-3. Les marqueurs de type épithéliaux et mésenchymateux sont restés sans modifications suite à l'expression ectopique des domaines TMU et TMU+1R chez les cellules SKOV-3. Ces deux modèles gain de fonction n'ont pas non plus varié ni empêché la capacité migratoire de la lignée parentale SKOV-3. Tous ces résultats nous suggèrent que les domaines TMU et TMU+1R ne sont pas suffisants pour produire les changements nécessaires pour stimuler un phénotype épithélial, caractéristique retrouvée chez les cellules CA125 positives. En appréciant la grande taille de la protéine CA125 et le nombre élevé de répétitions qu'elle peut contenir (jusqu'au 60), nous considérons important d'essayer l'option d'exprimer plus qu'une seule répétition du domaine extracellulaire de CA125 chez les cellules SKOV-3.

### 34. Conclusions et modèle proposé

Plus de 25 ans ont passé depuis la découverte du marqueur de cancer ovarien CA125. En ayant comme modèles d'autres mucines, toutes ces années ont certes permis d'en apprendre sur sa séquence, sa structure et certaines de ses fonctions. Cependant, les rôles exacts de cette mucine demeurent encore à ces jours inconnus et méritent d'être étudiés. En effet, le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus létal. Nous savons également que les niveaux d'expression de CA125 corrélient avec la progression ou la régression de la tumeur et que CA125 pourrait avoir des rôles dans la progression du cancer de l'ovaire (HOGDALL et al, 2007; BERCHUCK et al, 1989; SAWIRIS et al, 2002).

Ce projet consistait donc à vérifier l'impact de CA125 sur le potentiel malin des cellules de cancer de l'ovaire, le processus de transition épithélium mésenchymateuse et l'effet de l'expression de différents domaines (cytoplasmiques et extracellulaires) de CA125 dans des cellules CA125 négatives sur ces processus. Rassemblant tous les résultats tirés des observations obtenues dans ce projet, un modèle peut ainsi être proposé (Figure 57). À des stades précoces du carcinome ovarien, les cellules cancéreuses CA125 positives exhibent un aspect épithélial, avec des complexes de jonction cellulaire fonctionnels et une incapacité de migrer. Les patientes présentent un bon pronostique et une bonne survie (HOGDALL et al, 2007). Dans notre modèle, ces mêmes caractéristiques peuvent être retrouvées chez les cellules de la lignée parentale NIH : OVCAR-3. Nous avons observé que lorsque nous effectuons un knockdown de CA125 à la surface cellulaire, ces cellules se transformaient en cellules d'aspect mésenchymateuse avec dysfonction des complexes de jonction et

acquerraient un potentiel migratoire important. Par conséquent, cela nous a permis de mettre en évidence l'influence de CA125 dans l'EMT des cellules de cancer de l'ovaire. Chez les mêmes cellules, nous avons pu déterminer aussi que l'EGF semble être un des facteurs principaux qui régulent le phénotype EMT de ces cellules. Toutes ces données nous ont permis d'établir une corrélation possible entre les clones CA125 knockdown construits au laboratoire et les cellules de la surface épithéliale normale de l'ovaire (OSE). Si nous nous rappelons, elles partagent plusieurs caractéristiques qui nous font penser à la possibilité que peut-être nos clones CA125 knockdown se rapprochent ou se ressemblent aux OSE en considérant que les deux sont des cellules CA125 négatives, pas tumorigéniques (les clones CA125 knockdown ayant perdu complètement leur potentiel tumorigénique), avec un programme d'EMT leur permettant migrer suite à la stimulation d'EGF.

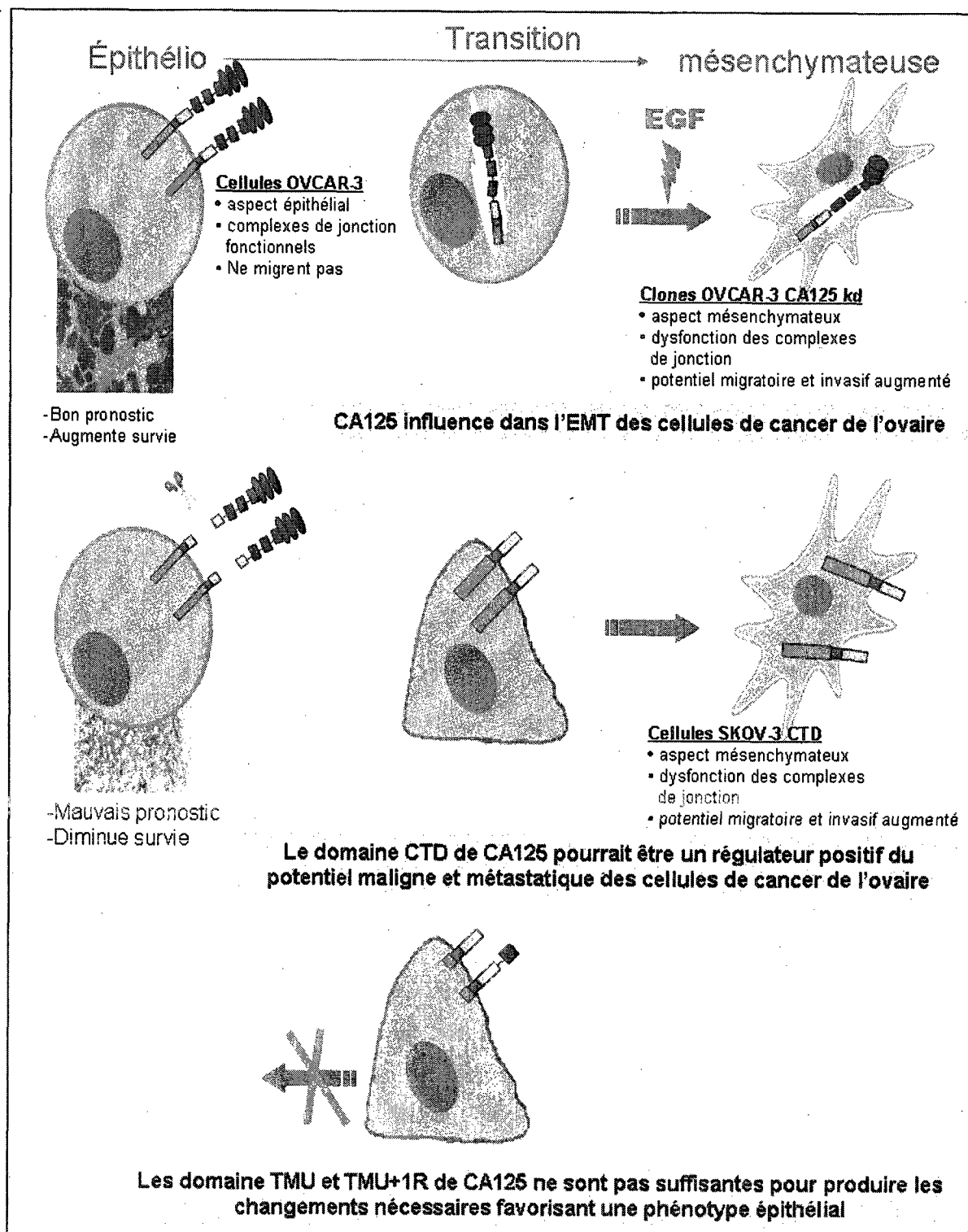
À des stades avancés du cancer épithélial de l'ovaire, CA125 est clivé dans la région du domaine unique (extracellulaire et justamembranaire) et n'est donc plus détectable à la surface des cellules tumorales alors que la portion extracellulaire de la protéine devient détectable dans le sang de la patiente. Ces cellules tumorales exprimant ainsi que le reste du produit de clivage associé à la membrane cellulaire sont à ce moment très agressives et ont acquis un potentiel métastatique important. Ce comportement dénote un mauvais pronostic et diminution du pourcentage de survie (HOGDALL et al, 2007). Lorsque nous avons transfecté nos cellules SKOV-3 CA125 négatives avec le domaine CTD de CA125, un domaine très similaire au produit de clivage CA125 restant associé à la membrane cellulaire, nous avons constaté une augmentation du caractère agressif des cellules. Nous proposons donc, que le domaine CTD de CA125 et le produit de clivage de CA125 restant associé à la

membrane cellulaire seraient des régulateurs positifs du potentiel maligne et métastatique des cellules de cancer de l'ovaire.

Finalement, l'intention de regagner certaines caractéristiques de type épithéliales chez nos populations SKOV-3 TMU ou TMU+1R n'a pas été reproductible avec l'expression isolée de ces domaines. Il reste envisageable l'alternative de construire des populations qui expriment plus qu'une seule répétition du domaine extracellulaire de CA125.



**Figure 57: Modèle proposé**



### 35. Perspectives

Suite aux résultats observés sur l'importance de l'EGF dans la stimulation de la migration des cellules CA125 knockdown et dans la transition épithélium-mésenchymateuse, nous considérons intéressant de vérifier le statut des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux en absence de sérum et en présence exclusive d'EGF. Les voies de signalisation qui peuvent être déclenchées par EGF/EGFR, comme PI3K/AKT, MAPK, et qui sont impliquées dans le processus de migration et d'EMT pourront être étudiées plus profondément. Il sera aussi très intéressant à investiguer chez nos cellules l'importance de la voie de signalisation des intégrines pour évaluer s'il existe une activation consécutive, simultanée ou indépendante d'une voie et de l'autre. Afin de raffiner notre modèle présenté à la figure 57, il resterait intéressant savoir si le CTD de CA125 permettrait la progression tumorale chez les cellules OVCAR-3 dont il agirait comme un dominant négatif et entrainerait l'EMT même si les cellules OVCAR-3 expriment CA125. Il serait aussi intéressant d'exprimer le domaine CTD de CA125 chez les clones CA125 knockdown pour observer si ce domaine (et par analogie le produit de clivage de CA125 restant associé à la membrane cellulaire) confère un phénotype plus agressif et encore plus mésenchymateux tel qu'observé chez les cellules SKOV-3 CTD.

## **. REMERCIEMENTS**

Je voudrais, tout d'abord, remercier ma directrice de recherche, Dre Claudine Rancourt, de m'avoir offert la possibilité de m'aventurer dans le champ de la recherche. Lors de ces études, j'ai développé de nouveaux outils intellectuels et un esprit critique face aux différentes découvertes scientifiques. Merci de m'aider et m'encourager à persister dans mes objectifs professionnels et personnels.

Je remercie Dr Alain Piché pour le temps accordé et les commentaires constructifs qu'il a apportés à mon projet.

Je veux remercier aussi les étudiants et étudiantes ainsi que les technicien/nes et assistants de laboratoire : Denis Lane, Isabelle Matte, Jean Philippe Babeau, Martine Migneault, Catherine Thériault, Nadzeya Goncharenko; toutes d'excellentes personnes, toujours disponibles et avec qui j'ai partagé des moments difficiles, amusants et inoubliables. Merci aussi aux anciennes étudiantes du laboratoire, Julie Beaudin et Marianne Boivin, pour avoir produit les constructions cellulaires que j'ai utilisées et qui m'ont permis la réalisation de mon projet. De plus, j'aimerais remercier les techniciens en microscopie électronique du département de biologie cellulaire pour leur assistance dans la préparation des échantillons et l'usage du microscope électronique.

Je tiens aussi à remercier Dr Antonio Conconi et Dr Jean François Beaulieu d'avoir accepté le travail d'évaluer ce mémoire.

Finalement, un grand merci à Andrés, mon mari, qui m'accompagné inconditionnellement; à Tomas et Sofia, mes enfants, c'est à eux que je découvre plus que jamais, le plaisir d'apprendre, de s'efforcer, de défendre leurs idéaux.

## RÉFÉRENCES

Ahmed N, Oliva KT, Barker G, Hoffmann P, Reeve S, Smith IA, Quinn MA, Rice GE. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers in ovarian cancer. *Proteomics*, 5(17), p. 4625-4636, 2005.

Abelev, GI and Eraiser TL. On the path to understanding the nature of cancer. *Biochemistry (Moscow)*. 73(5): 605-618, 2008.

Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American Journal of Cell Physiology*. 290(6): C1532–C1542, 2006.

Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA; Gynecologic Oncology Group. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*. 354(1): 34-43, 2006.

Balzac F, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *Journal of Cell Science*. 118(20): 4765-4783, 2005.

Auersperg N, Edelson MI, Mok SC, Johnson SW, Hamilton TC. The biology of ovarian cancer. *Seminars in Oncology*. 25(3) :281-304, 1998.

Auersperg N, Ota T, Mitchell GW. Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *International Journal of Gynecological Cancer*. 12(6): 691-703, 2002.

Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*. 22(2):255-258, 2001.

Baldus SE, Engelmann K, Hanisch F-G. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 41(2): 189–231, 2004.

Barbati A, Broccucci L, Anceschi MM, Cosmi EV. Regulation of CA 125 production by amnion and WISH cells in culture. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 164(5 Pt 1): 1355-1359, 1991.

Barrallo-Gimeno A, and Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 132(14): 3151–3161, 2005.

Bast RC Jr, Brewer M, Zou C, Hernandez MA, Daley M, Ozols R, Lu K, Lu Z, Badgwell D, Mills GB, Skates S, Zhang Z, Chan D, Lokshin A, Yu Y. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? Recent Results in Cancer Research. 174: 91-100, 2007.

Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. The Journal of Clinical Investigation. 68(5):1331-1337, 1981.

Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. The New England journal of medicine. 309(15): 883-887, 1983.

Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA125: The past and the future. The International Journal of Biologicals Markers. 13(4): 179-187, 1998.

Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P and Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. Science. 275(5308): 1930-1934, 1997.

Beaudin J. Anticorps monovalents modifies anti-CA125: Nouveaux inhibiteurs de l'antigène tumoral CA125. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 142 pages. Juin 2003.

Behrens, J, Mareel MM, Van Roy FM and Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. The Journal of Cell Biology. 108(6):2435-2447, 1989.

Belisle JA, Gubbels JAA, Raphael CA, Migneault M, Rancourt C, Connor JP, Patankar MS. Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). Immunology. 122(3): 418-429, 2007.

Berchuck A, Schildkraut JM, Wenham RM, Calingaert B, Ali S, Henriott A, Halabi S, Rodriguez GC, Gertig D, Purdie DM, Kelemen L, Spurdle AB, Marks J, Chenevix-Trench G. Progesterone receptor promoter +331A polymorphism is associated with a reduced risk of endometrioid and clear cell ovarian cancers. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 13(12):2141-2147, 2004.

Berchuck A, Soisson AP, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Boyer CM, Kinney RB, McCarty KSJ, Bast RCJ. Immunohistochemical expression of CA 125 in endometrial adenocarcinoma: correlation of antigen expression with metastatic potential. Cancer Research. 49: 2091-2095, 1989.

Berek JS and Bast RC Jr. Ovarian cancer. In: Kufe DW, Bast RC Jr, Hait W, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR Holland JF, Frei E. III (eds) Holland-frei Cancer Medicine, 7<sup>th</sup> edition. Derek, Hamilton, Ontario. Pages: 1543-1568, 2006.

Berx G, Nollet F and van Roy F. Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell adhesion and communication*. 6:171–184, 1998.

Berx G and Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Research* 3(5): 289-293, 2001.

Biesalski HK, Bueno de Mesquita B, Chesson A, Chytil F, Grimble R, Hermus RJ, Köhrle J, Lotan R, Norpoth K, Pastorino U, Thurnham D. European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. *Lung Cancer Panel. CA: a cancer journal for clinicians*. 48(3):167–176, 1998.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nature Reviews. Cancer* 1(1): 46–54, 2001.

Boivin M. Implication de CA125 (MUC16) dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents génotoxiques. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 146 pages. Juin 2005.

Bouck N, Stellmach V. and Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Reserch*. 69: 135–174, 1996.

Brown JV 3rd, Goldstein BH, Duma CM, Rettenmaier MA, Micha JP. Gamma-knife radiosurgery for the treatment of ovarian cancer metastatic to the brain. *Gynecologic Oncology*. 97(3) :858-861, 2005.

Bryan TM and Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Cell Biology*. 11: 318–324, 1999.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio AM, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*. 2: 76–83, 2000.

Caravallaro U and Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and. Ig-CAMs in cancer. *Nature Review Cancer* 4: 118-132, 2004.

Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays*. 25(1): 66-71, 2003.

Carraway KL 3rd, Ramsauer VP, Carothers Carraway CA. Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs. *Journal of Cell Biochemistry*. 96(5): 914–26, 2005.

- Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Letters*. 176(2):123-8, 2002.
- Chambers AF and Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*. 89: 1260–1270, 1997.
- Chaturvedi P, Singh AP, Chakraborty S, Chauhan SC, Bafna S, Meza JL, Singh PK, Hollingsworth MA, Mehta PP, Batra SK. MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Research*. 68(7): 2065-2070, 2008.
- Chauhan SC, Singh AP, Ruiz F, Johansson SL, Jain M, Smith LM, Moniaux N, Batra SK. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Modern Pathology*. 19(10): 1386-1394, 2006.
- Christ B and Ordahl CP. Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology (Berlin)* 191 (5): 381-396, 1995.
- Cmelak AJ, Kapp DS. Long-term survival with whole abdominopelvic irradiation in platinum-refractory persistent or recurrent ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 65(3): 453-460, 1997.
- Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *The Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 70: 3324–3328, 1973.
- Coussens LM and Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chemistry and Biology*. 3: 895–904, 1996
- Croce CM. Molecular origins of the cancer. *Oncogenes and cancer. The New England Journal of Medicine*. 358(5): 502-511, 2008.
- Daly M, Orams GI. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. *Seminars in Oncology*. 25(3): 255-264, 1998.
- Demir AY, Groothuis PG, Nap AW, Punyadeera C, de Goeij AF, Evers JL, Dunselman GA. Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells. *Human Reproduction*. 19(1): 21-29, 2004.
- Dorigo O et Berek JS. CA125: megadaltons of novel opportunities. *Gynecologic oncology*. 104 (3): 505-507, 2007.
- Dowdy SC, Gostout BS, Shridhar V, Wu X, Smith DI, Podratz KC, Jiang SW. Biallelic methylation and silencing of paternally expressed gene 3 (PEG3) in gynecologic cancer cell lines. *Gynecologic Oncology*. 99(1):126-134, 2005.



- Edme N, Downward J, Thiery JP, Boyer B. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. *Journal of Cell Science*. 115(12): 2591–2601, 2002.
- English DR, Armstrong BK, Kricker A, Fleming C. Sunlight and cancer. *Cancer causes & control*. 8(3): 271–283, 1997.
- Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA, Growth factors. In *Cancer Medicine*. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW and Weichselbaum RR, Editors. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins: 41–64, 1997.
- Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*. 38(2): 87–95, 2001.
- Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, Parmley TH, Quirk JG, O'Brien TJ. CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumor Biology*. 18: 278–289, 1997.
- Finger LR, Harvey RC, Moore RCA, Showe LC, Croce CM. A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science*. 234: 982–985, 1986.
- Foley KP and Eisenman RN. Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mx1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1423: M37–47, 1999.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW and Weichselbaum RR, Editors. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins: 41–64, 1997.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D and Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*. 113(1):173–185, 1991.
- Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annual Review of Physiology*. 57: 607–634, 1995.
- Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6 (3): 339–353, 2001.
- Getsios S, Huen AC and Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5 (4): 271–281, 2004.
- Giuntoli RL 2nd, Rodriguez GC, Whitaker RS, Dodge R, Voynow JA. Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Research*. 58(23): 5546–5550, 1998.

Gloushankova NA. Changes in Regulation of Cell-Cell Adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Moscow)*. 73(7):742-50, 2008.

Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*. 89(10):2068-2075, 2000.

Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *BioEssays* 26(5): 497-511, 2004.

Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutation Research*. 566(1): 9–20, 2004.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Research*. 63(9): 2172–2178, 2003.

Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan YM, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Garcia C, Georgescu AM, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Ho I, Huang W, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Larionov V, Leem SH, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Malfatti S, Martinez D, McCready P, Medina C, Morgan J, Nelson K, Nolan M, Ovcharenko I, Pitluck S, Pollard M, Popkie AP, Predki P, Quan G, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, She X, Smith D, Slezak T, Solovyev V, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wagner M, Wheeler J, Wu K, Xie G, Yang J, Dubchak I, Furey TS, DeJong P, Dickson M, Gordon D, Eichler EE, Pennacchio LA, Richardson P, Stubbs L, Rokhsar DS, Myers RM, Rubin EM, Lucas SM. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 428 (6982): 529-535, 2004.

Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I, Patankar MS. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Molecular Cancer*. 5(1): 50-65, 2006.

Gum JR Jr, Crawley SC, Hicks JW, Szymkowski DE, Kim YS. MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 291(3): 466-475, 2002.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84(3): 345-357, 1996.

- Gumbiner BM. Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *The Journal of Cell Biology*. 148 (3): 399-404, 2000.
- Gururaja TL, Ramasubbu N, Venugopalan P, Reddy MS, Ramalingam K, Levine MJ. Structural features of the human salivary mucin, MUC7. *Glycoconjugate Journal*. 15(5): 457-467, 1998.
- Hanahan D. and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1): 57-70, 2000.
- Hardardottir H, Parmley TH 2nd, Quirk JG Jr, Sanders MM, Miller FC, O'Brien TJ. Distribution of CA 125 in embryonic tissues and adult derivatives of the fetal periderm. *American journal of obstetrics and gynecology*. 163(6): 1925-1931, 1990.
- Harris CC. P53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*. 17: 1187-1198, 1996.
- Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*. 223: 363-368, 1969.
- Hatrup C, Gendler S. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*. 70: 431-437, 2008.
- Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *American journal of kidney diseases*. 26(4): 678-690, 1995.
- Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*. 62: 1180-1190, 1997.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of Cell Biology*. 148(4): 779-790, 2000.
- Hermiston ML, and Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *The journal of cell biology*. 129: 489-506, 1995.
- Hermiston ML, Wong MH and Gordon JI. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes & Development*. 10 (8): 985-996, 1996.
- Hirohashi S. Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion System in Human Cancers. *American Journal of Pathology*. 153 (2): 333-33, 1998.

Hogdall EVS, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Kjaerbye-Thygesen A, Gayther S, Jacobs IJ, Hogdall CK. CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients from the Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study. *Gynecologic Oncology*. 104: 508-515, 2007.

Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*. 4(1): 45-60, 2004.

Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in Surgical Oncology*. 19(1): 3-10, 2000.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H and Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 110(3): 341-350, 2002.

Hatrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*. 70: 431-57, 2008.

Hu YP, Haq B, Carraway KL, Savaraj N, Lampidis TJ. Multidrug resistance correlates with overexpression of Muc4 but inversely with P-glycoprotein and multidrug resistance related protein in transfected human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 65(9): 1419-1425, 2003.

Hunter VJ, Daly L, Helms M, Soper JT, Berchuck A, Clarke-Pearson DL, Bast RC Jr. The prognostic significance of CA 125 half-life in patients with ovarian cancer who have received primary chemotherapy after surgical cytoreduction. *American journal of obstetrics and gynecology*. 163(4 Pt 1): 1164-1167, 1990.

Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BA, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BA, Bast RC Jr. Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *Journal of the National Cancer Institute*. 84(23): 1793-1798, 1992.

Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *British journal of obstetrics and gynecology*. 97(10): 922-929, 1990.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 56(2): 106-130, 2006.

Jones NP, Peak J, Brader S, Eccles SA, Katan Met. PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. *Journal of Cell Science*. 118(12): 2695-2706, 2005.

Kabawat SE, Bast RC, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens on

human ovarian tumors of serous, endometrioid and clear cell types. *American Journal of Clinical Pathology*. 79: 98-104, 1983.

Kalluri R and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 112(12): 1776-1784, 2003.

Kaneko SJ, Gerasimova T, Smith ST, Lloyd KO, Suzumori K, Young SR. CA125 and UQCRFS1 FISH studies of ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 90 (1): 29-36, 2003.

Kang Y and Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 118(3): 277-279, 2004.

Kemler R. From cadherin to catenin: cytoplasmic protein interaction and regulation of cell adhesion. *Trend in Genetics*. 9(9): 317-321, 1993.

Khatri IA, Wang R, Forstner JF. SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-module cleavage, association of fragments and membrane targeting of rat intestinal mucin Muc3. *The Biochemical Journal*. 372 (1): 263-270, 2003.

Kim SH, Jen WC, De Robertis EM and Kintner C. The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in *Xenopus* embryos. *Current Biology*. 10 (14): 821-830, 2000.

Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation*. 109(5): 571-577, 2002.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *The Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 68: 820-823, 1971.

Knudson AG. Mutation and human cancer. *Advances in Cancer Reserch*. 17: 317-352, 1973.

Konishi I, Fendrick JL, Parmley TH, Quirk JG Jr, O'Brien TJ. Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1 (1): 89-96, 1994.

Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, Collins SJ, Witte ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *The Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 82: 1810-1814, 1985.

Kohlgraf KG, Gawron AJ, Higashi M, Meza JL, Burdick MD, Kitajima S, Kelly DL, Caffrey TC, Hollingsworth MA. Contribution of the MUC1 tandem repeat and cytoplasmic tail to invasive and metastatic properties of a pancreatic cancer cell line. *Cancer Research*. 63(16): 5011-5020, 2003.

Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *Journal of internal medicine*. 251(6): 455–466, 2002.

Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of internal medicine*. 252(3): 206–224, 2002.

Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M. and Kemler R. A role for cadherins in tissue formation. *Development*. 122 (10): 3185–3194, 1996.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 24(50): 7443–7454, 2005.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*. 172 (7):973–981, 2006.

Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, Smorodinsky NI, Rubinstein DB, Wreschner DH. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (39): 33374–33386, 2005.

Lloyd KO, Yin BW, Kudryashov V. Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *International journal of cancer*. 71(5): 842–850, 1997.

Lodish H, Berk A, Zipursk, SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. New York, 2000.

Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut*. 47(6) :792–800, 2000.

Li Y, Bhargava MM, Joseph A, Jin L, Rosen EM, Goldberg ID. Effect of hepatocyte growth factor/scatter factor and other growth factors on motility and morphology of non-tumorigenic and tumor cells. *In Vitro Cellular and Development Biology. Animal*. 30A(2): 105–110, 1994.

Lynch HT, Casey MJ, Shaw TG, Lynch JF. Hereditary Factors in Gynecologic Cancer. *The Oncologist*. 3(5): 319–338, 1998.

Maeda T, Inoue M, Koshiba S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Motoda Y, Kobayashi A, Hiroyasu F, Shirouzu M, Terada T, Hayami N, Ishizuka Y, Shinya N, Tatsuguchi A, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T, Yokoyama S. Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16). *Journal of Biological Chemistry*. 279 (13): 13174–13182, 2004.

Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes & Development*. 13(17): 2207-2217, 1999.

McNeil H, Ozawa M, Kemler R, and Nelson WJ. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell*. 62(2): 309-316, 1990.

Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA 125 in benign gynecological conditions. *The International journal of biological markers*. 13(4): 231-237, 1998.

Menke A, Philippi C, Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Adler G, Wedlich D. Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research*. 61(8): 3508-3517, 2001.

Meyer T, Rustin GJ. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 82(9): 1535-1538, 2000.

Migneault M. Détermination des rôles du domaine extracellulaire de CA125 (MUC16) dans le cancer de l'ovaire. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 135 pages. Septembre 2007.

Mills GB, Lu Y, Fang X, Wang H, Eder A, Mao M, Swaby R, Cheng KW, Stokoe D, Siminovich K, Jaffe R, Gray J. The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol-3kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis and therapy. *Seminars in oncology*. 28(5 Suppl 16):125-141, 2001.

Mimeault M, Batra SK. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis*. 27(1):1-22, 2006.

Mimeault M, Batra SK. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 24(11): 2319-2345, 2006.

Mimeault M, Pommery N, Henichart JP. New advances on prostate carcinogenesis and therapies: involvement of EGF-EGFR transduction system. *Growth Factors*. 21(1):1-14, 2003.

Moniaux N, Andrianifahanana M, Brand RE, Batra SK. Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *British Journal of Cancer*. 91(9): 1633-1638, 2004.

Murdoch WJ. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 71(4):529-543, 1996.

Murdoch WJ, Townsend RS, McDonnell AC. Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biology of Reproduction*. 65(5):1417-1424, 2001.

- Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Current Opinion in Cell Biology*. 13 (5): 600-603, 2001.
- Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 106(2): 353-361, 1994.
- Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nature Reviews. Cancer*. 5(5): 355-366, 2005.
- Näthke IS, Hinck LE, and Nelson WJ. Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible mechanisms for modulation of cadherin function, organization, and distribution. *Journal of Cell Science*. 17(Suppl.):139- 145, 1993.
- Nieto, MA. The early steps of neural crest development. *Mechanisms of Development*. 105(1-2): 27-35, 2001.
- Nieto, MA. The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 3(3):155-166, 2002.
- Nishimoto A, Yu Y, Lu Z, Mao X, Ren Z, Watowich SS, Mills GB, Liao WS, Chen X, Bast RC Jr, Luo RZ. A Ras homologue member I directly inhibits signal transducers and activators of transcription 3 translocation and activity in human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Research*. 65(15):6701-6710, 2005.
- O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumor Biology*. 22 (6): 348-366, 2001.
- O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K. The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumor Biology*. 23 (3): 154-169, 2002.
- O'Brien TJ, Hardin JW, Bannon GA, Norris JS, Quirk JG Jr. CA 125 antigen in human amniotic fluid and fetal membranes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 155(1): 50-55, 1986.
- O'Brien TJ, Raymond LM, Bannon GA, Ford DH, Hardardottir H, Miller FC, Quirk JG Jr. New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA 125 epitope. *American journal of obstetrics and gynecology*. 165(6):1857-1864, 1991.
- O'Day D. Cell adhesion molecules: Types et functions. BIO315HF Avances cell biology. UTM. Lecture 5, 2006.
- O'Reilly KM, McLaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ. Asbestos-related lung disease. *American family physician*. 75(5): 683-688, 2007.



Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*. 5(1): 19-24, 2004.

Palmai-Pallag T, Khodabukus N, Kinarsky L, Leir SH, Sherman S, Hollingsworth MA, Harris A. The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *FEBS Journal*. 272: 2901-2911, 2005.

Pankaj K and Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *TRENDS in Cell Biology*. 16(9): 467-476, 2006.

Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi A, Schmitt FC. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Research*. 9(5): 214-226, 2007.

Patankar MS, Jing Y, Morrison JC, Belisle JA, Lattanzio FA, Deng Y, Wong NK, Morris HR, Dell A, Clark GF. Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecology Oncology*. 99(3): 704-713, 2005.

Patton SE, Martin ML, Nelson LL, Fang XY, Mills GB, Bast RC Jr, Ostrowsky MC. Activation of the Ras-MAP pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research*. 58(): 2253-2259, 1998.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*. 7(6):415-428, 2007.

Peinado H, Portillo F and Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis *The International Journal of Developmental Biology*. 48 : 365-375, 2004.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H and Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 392(6672):190-193, 1998.

Peter S, Beglinger C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion*. 75(1): 25-35, 2007.

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Rønnov-Jessen L. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American journal of pathology*. 162(2): 391-402, 2003.

Pinard M. CA125, un régulateur négatif du potentiel invasif des cellules cancéreuses de l'ovaire? Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. Août 2005.

Pino V, Ramsauer VP, Salas P, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Membrane mucin Muc4 induces density-dependent changes in ERK activation in mammary epithelial and tumor cells: role in reversal of contact inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(39): 29411-29420, 2006.

- Polakis, P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*. 14(15): 1837–1851, 2000.
- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 17 (1): 45-51, 2007.
- Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Cell Science*. 118(19): 4325-4326, 2005.
- Rahn JJ, Chow JW, Horne GJ, Mah BK, Emerman JT, Hoffman P, Hugh JC. MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clinical and Experimental Metastasis*. 22(6): 475-483, 2005.
- Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, and Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92 (19): 8813-8817, 1995.
- Rodier JM, Vallés AM, Denoyelle M, Thiery JP, Boyer B. pp60c-src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line. *The Journal of cell biology*. 131(3): 761-773, 1995.
- Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, Sigman CC, Parkinson DR, Ruddon RW. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 10(11): 3919-3926, 2004.
- Salamanca CM, Maines-Bandiera SL, Leung PC, Hu YL, Auersperg N. Effects of epidermal growth factor/hydrocortisone on the growth and differentiation of human ovarian surface epithelium. *Journal of the Society for Gynecology Investigation*. 11(4): 241-451, 2004.
- Sankaranarayanan R and Ferlay J. Worldwide Burden of Gynaecological Cancer: the size of the problem. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 20 (2): 207-225, 2006.
- Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 23(10):912–923, 2001.
- Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, Cheadle C, Teichberg D, Morin PJ. Development of a Highly Specialized cDNA Array for the Study and Diagnosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 62: 2923–2928, 2002.
- Schock F and Perrimon N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 18:463-493, 2002.
- Schwartz MA. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *The journal of cell biology*. 139(3): 575-578, 1997.

Shay JW and Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*. 33: 787–791, 1997.

Sher CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 116(2): 235-246, 2004.

Shibamoto S, Hayakawa M, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Ito F. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta stimulate both cell growth and migration of human gastric adenocarcinoma cells. *Cell structure and function*. 17(3): 185-190, 1992.

Shook D and Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development*. 120 (11): 1351-1383, 2003.

Singh AP, Chaturvedi P, Batra SK. Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy *Cancer Research*. 67(2): 433-436, 2007.

Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK. Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Research*. 64(2) :622-630, 2004.

Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, Jain M, Lele SM, Davis JS, Remmenga S, Batra SK. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *The Lancet Oncology*. 9(11): 1076-1085, 2008.

Singh PK et Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *TRENDS in Cell Biology*. 16 (9): 467-476, 2006.

Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences.USA* 92: 4562–4566, 1995.

Skates SJ, Xu FJ, Yu YH, Sjövall K, Einhorn N, Chang Y, Bast RC Jr, Knapp RC. Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers. *Cancer*. 76(10): 2004-2010, 1995.

Sporn MB. The war on cancer. *The Lancet*. 347: 1377–1381, 1996.

Stanbridge EJ, Suppression of malignancy in human cells. *Nature*. 260: 17–20, 1976.

Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Molecular Biosystems*. 4(8): 835-850, 2008.

Takahashi K. and Suzuki K. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell- cell adhesion. *Experimental cell research*. 226: 214-222, 1996.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator. *Science*. 251(5000): 1451-1455, 1991.

Takeichi M. Morphogenic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology*. 7(5): 619-627, 1995.

Tamada Y, Takeuchi H, Suzuki N, Susumu N, Aoki D, Irimura T. Biological and therapeutic significance of MUC1 with sialoglycans in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Science*. 98(10): 1586-1591, 2007.

Tanaka T, Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, McAvoy JW, Liu CY, Azhar M, Doetschman T, Kao WW. Fibroblast growth factor 2: roles of regulation of lens cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in response to injury. *Molecular Vision*. 15(10): 462-467, 2004.

Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1455 (2-3): 301-313, 1999.

Tepass U, Godt D and Winklbauer R. Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Current Opinion in Genetics and Development*. 12 (5): 572-582, 2002.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Review Cancer*. 2(6):442-54, 2002.

Thiery JP and Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 7 (2): 131-142, 2006.

Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells. *The American journal of pathology*. 155(3): 787-798, 1999.

Troyanovsky SM. Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *The European Journal of Cell Biology*. 84:225-233, 2005.

Tso CL, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, Chen Z, Yoshimoto K, Mischel PS, Cloughesy TF, Liau LM, Nelson SF. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Molecular Cancer Research*. 4(9): 607-619, 2006.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 229:1390-1393, 1985.

Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ and Takeichi M. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *The Journal of Cell Biology*. 135 (3):767-779, 1996.

- Van Itallie CM and Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*. 68:403–429, 2006.
- Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development*. 18 (10):1131-1143, 2004.
- Venkiteswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins CC, Vincent PA, Pumiglia K, Kowalczyk AP. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and  $\beta$ -catenin. *American Journal of Physiology*. 283: C811–C821, 2002.
- Vleminckx K, Vakaet L, Mareel Jr.M, Fiers W and van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66(1):107–119, 1991.
- Volpert OV, Dameron KM and Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 14: 1495–1502, 1997.
- Wang C, Yuan Y, Hunt RH. The association between *Helicobacter pylori* infection and early gastric cancer: a meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 102(8): 1789–1798, 2007.
- Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR et Hollingsworth MA. Nuclear Association of the Cytoplasmic Tail of MUC1 and  $\beta$ -Catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (39): 38029-38039, 2003.
- Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology*. 129(1): 255-265, 1995.
- Wheelock MJ, and Jensen PJ. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *The journal of Cell Biology*. 117: 415-425, 1992.
- Willert K, and Jones, KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development*. 20(11):1394-1404, 2007.
- Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Letters*. 408(2): 121-123, 1997.
- Yamada S and Nelson WJ. Synapses: sites of cell recognition, adhesion and functional specification. *Annual Review Biochemistry*. 76:267–294, 2007.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117(7): 927-939, 2004.

- Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Research*. 66(9): 4549–4552, 2006.
- Yap AS, Briher WM, Pruschy M, Gumbiner BM. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Current Biology*. 7(5):308-315, 1997.
- Yeh-Shiu C, Thomas WA, Eder O, Pincet F, Perez E, Thiery JP, and Dufour S. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42 *Journal of the Cell Biology*. 167(6): 1183 – 1194, 2004.
- Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *The Journal of biological chemistry*. 276(29): 27371-27375, 2001.
- Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 90(6):447-454, 1998.
- Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *Journal of cell science*. 108 (Pt 1):127-14, 1995.
- Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T and Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *The Proceeding of National the Academy of Sciences. USA*. 92(16): 7416-7419, 1995.
- Zaridze DG. Molecular epidemiology of the cancer. *Biochemistry (Moscow)*. 13 (5): 532-542, 2008.
- Zhu AJ, and Watt FM. Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Journal of cell science*. 109(13): 3013-3023, 1996.
- Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition *Nature Cell Biology*. 6(10): 931–940, 2004.
- Zurawski VR, Davis HM, Finkler NJ, Harrison CL, Bast RC, Knapp RC. Tissue distribution and characteristics of the CA125 antigen. *Cancer Reviews*. 11-12 : 102-108, 1988.
- zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 254(5035): 1167-1173, 1991.

*Sites Internet :*

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html>. (OMS, 2007)

[http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/~/\\_media/CCS/Canada%20wide/Files%20List/English%20files%20heading/pdf%20not%20in%20publications%20section/Canadian%20Cancer%20Society%20Statistics%20PDF%202008\\_614137951.ashx](http://www.cancer.ca/Canada-wide/About%20cancer/Cancer%20statistics/~/_media/CCS/Canada%20wide/Files%20List/English%20files%20heading/pdf%20not%20in%20publications%20section/Canadian%20Cancer%20Society%20Statistics%20PDF%202008_614137951.ashx)